



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Rafaela David Lourenço Victorino da Rocha Pinto

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Vesículas Extracelulares de Protozoários Flagelados: Potencial Aplicação em Vacinas” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Cláudia Maria Branco da Gama, da Dra. Dina Sofia de Freitas Gonçalves Simões e da Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2020



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Rafaela David Lourenço Victorino da Rocha Pinto

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Vesículas Extracelulares de Protozoários Flagelados: Potencial Aplicação em Vacinas” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Cláudia Maria Branco da Gama, da Dra. Dina Sofia de Freitas Gonçalves Simões e da Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2020

DECLARAÇÃO DE HONRA

Eu, Rafaela David Lourenço Victorino da Rocha Pinto, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2015239423, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Vesículas Extracelulares de Protozoários Flagelados: Potencial Aplicação em Vacinas” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 10 de setembro de 2020.

Rafaela David Lourenço Victorino da Rocha Pinto

(Rafaela David Lourenço Victorino da Rocha Pinto)

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Maria do Céu Sousa, pela disponibilidade e orientação.

À equipa do Controlo de Qualidade da Bluepharma (especialmente à Daniela, à Maria, à Mariana e à Patrícia) por todo o apoio, carinho e conhecimentos transmitidos durante o estágio. Levo-vos no coração.

À Dra. Cláudia Gama por me ter dado a oportunidade de estagiar na Bluepharma e também pela sua enorme disponibilidade.

À equipa da Farmácia Pátria pelo caloroso acolhimento e pelo tempo despendido e enorme paciência. Agradeço-vos do fundo do meu coração.

Ao Fefef, à Bea, às Anas, às Ritas e à Joana por me terem acompanhado ao longos destes 5 anos e por estarem lá sempre que precisei. Se fui feliz durante estes 5 anos foi graças a vocês.

A ti Coimbra!

Levar-te-ei sempre comigo.

À minha bisavó por ser a estrela que me guia e por sempre me proteger.

Ao meu irmão, por me desafiar a ser sempre melhor e a dar tudo de mim. Apesar das constantes discussões sei que posso sempre contar contigo e tu podes sempre contar comigo.

À madrinha Gu por ser uma pessoa incansável. Sem si nada disto seria possível. Sou grata por tê-la na minha vida.

À minha mãe e à minha avó, por terem sido pai e mãe ao mesmo tempo e por serem um exemplo a seguir.

Por nunca me deixarem desistir e acreditarem que seria sempre capaz de concretizar os meus sonhos.

Pelo apoio incansável.

Pela companhia nas inúmeras noites de estudo.

Por me limparem as lágrimas nos momentos de maior stress.

Por serem o meu porto seguro.

Nunca, em toda a minha vida, conseguirei agradecer tudo aquilo que fizeram e fazem por mim todos os dias.

Amo-vos.

ÍNDICE

CAPÍTULO I: RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

LISTA DE ABREVIATURAS	9
INTRODUÇÃO	10
A BLUEPHARMA	11
Departamento de CQ	11
ANÁLISE SWOT	13
PONTOS FORTES	13
Conhecimentos adquiridos	13
Formação contínua	15
Boa relação com a equipa e bom ambiente de trabalho	16
Receção e integração	16
Autonomia	17
PONTOS FRACOS	17
Acesso condicionado aos equipamentos	17
Duração do estágio	17
Escassa utilização dos equipamentos no decorrer do MICF	18
OPORTUNIDADES	18
Conta Ennov	18
Rastreabilidade dos dados	18
Expansão da empresa e perspetivas futuras	18
AMEAÇAS	19
COVID-19	19
Pouco contacto com os outros departamentos	19
APRECIACÕES FINAIS	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
ANEXOS	21

CAPÍTULO II: RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA

LISTA DE ABREVIATURAS	24
INTRODUÇÃO	25
ANÁLISE SWOT	25
PONTOS FORTES	26
Equipa de trabalho	26
Integração nas tarefas diárias da farmácia	26
Cooperação com instituições	27
Grupo de compras	27
Prescrição por Denominação Comum Internacional (DCI)	28
Localização	28
SIFARMA 2000® e Novo Módulo de Atendimento do SIFARMA	29
PONTOS FRACOS	29

Aconselhamento de Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM)	29
Ausência de preparação de medicamentos manipulados.....	30
Formações.....	30
OPORTUNIDADES	30
Atendimento.....	30
Prestação de serviços de saúde	31
Sistema de Preparação Individualizada de Medicação (PIM).....	31
AMEAÇAS	32
Receitas manuais.....	32
Conhecimento limitado em algumas áreas.....	33
Medicamentos esgotados	33
CASO PRÁTICO	34
APRECIÇÕES FINAIS	34
CAPÍTULO III: VESÍCULAS EXTRACELULARES DE PROTOZOÁRIOS FLAGELADOS: POTENCIAL APLICAÇÃO EM VACINAS	
LISTA DE ABREVIATURAS	37
RESUMO	39
ABSTRACT.....	40
INTRODUÇÃO	41
Vesículas extracelulares (VEs).....	41
Biogénese das VEs.....	42
Composição das VEs.....	43
Aplicações Clínicas das VEs.....	44
GIARDIA LAMBLIA	45
Giardíase	46
VEs na interação parasita-hospedeiro	46
LEISHMANIA SPP.	48
Leishmaniose.....	49
VEs na interação parasita-hospedeiro	49
TRYPANOSOMA SPP.	52
Tripanossomíases.....	53
VEs na interação parasita-hospedeiro	54
TRICHOMONAS VAGINALIS	58
Tricomoniase	58
VEs na interação parasita-hospedeiro	59
POTENCIAL APLICAÇÃO DAS VEs DE PARASITAS EM VACINAS	61
CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

CAPÍTULO I

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

Controlo de Qualidade

BLUEPHARMA – Indústria Farmacêutica, S.A.

COIMBRA



Sob a orientação da
Dra. Cláudia Maria Branco da Gama.

LISTA DE ABREVIATURAS

AP	<i>Analytical Procedure</i>
API	<i>Active Pharmaceutical Ingredient</i>
CQ	Controlo de Qualidade
DAG	Desenvolvimento Analítico e Galénico
FFUC	Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
FIR	<i>Failure Investigation Report</i>
FTIR	<i>Fourier-Transform Infrared Spectroscopy</i>
GC	<i>Gas Chromatography</i>
GQ	Garantia de Qualidade
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IF	Indústria Farmacêutica
LD	Laboratório de Dissoluções
LR	Laboratório de Rotina
MICF	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
MD	Meio de Dissolução
SOP	<i>Standard Operating Procedure</i>
SPEC	<i>Specification</i>
SWOT	<i>Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats</i>
UDU	<i>Uniformity of Dosage Unit</i>

INTRODUÇÃO

A vontade em realizar estágio curricular em Indústria Farmacêutica (IF) foi motivada pela constante curiosidade em expandir o meu conhecimento acerca de tudo o que envolve o ciclo dos medicamentos e as atividades que estão inerentes a todos os que atualmente se encontram no mercado farmacêutico e, também, com o intuito de ter uma melhor percepção acerca do funcionamento interno de uma IF.

Aquando da escolha dos locais para concretização do estágio curricular e tendo obtido excelentes recomendações de amigos que tinham realizado, em anos anteriores, estágio na Bluepharma, desde logo sabia que era nesta mesma indústria que gostaria de realizar o meu estágio.

Como critério de seleção, todos os alunos do quinto ano do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) que demonstraram querer estagiar na Bluepharma, foram sujeitos a uma entrevista. Nesta mesma entrevista, demonstrei todo o interesse em integrar o departamento de Controlo de Qualidade (CQ), no qual fui admitida para desempenhar funções desde 6 de janeiro a 31 de março de 2020.

A decisão de integrar este departamento resultou do facto de algumas unidades curriculares, tais como Tecnologia Farmacêutica e Química Farmacêutica me terem despertado interesse sobre os processos e análises que têm que ser realizados, de maneira a obter-se o medicamento com elevada eficácia terapêutica na sua forma mais segura, bem como o contributo e importância do farmacêutico nesta área em particular, garantindo assim a conformidade dos medicamentos e de tudo o que envolve a sua produção.

Este relatório compreende uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities e Threats*), onde me irei debruçar sobre os Pontos Fortes, os Pontos Fracos, as Oportunidades e, por fim as Ameaças, detetadas ao longo do meu estágio. Esta análise é uma ferramenta essencial, visto que nos permite fazer uma reflexão tendo em conta 2 perspetivas: a perspetiva interna (Pontos Fortes e Fracos) e a perspetiva externa (Oportunidades e Ameaças).

A BLUEPHARMA

A Bluepharma é uma empresa Farmacêutica de capitais portugueses, cuja sede se localiza em São Martinho do Bispo, Coimbra. Iniciou a sua atividade em fevereiro de 2001, na sequência da aquisição de uma das mais promissoras e contemporâneas unidades industriais do país, pertencente à multinacional alemã Bayer, por um grupo de profissionais ligados ao setor farmacêutico. Na altura, dedicava-se apenas à produção industrial de medicamentos para terceiros a nível nacional e contava somente com 58 colaboradores.¹

Presentemente, o grupo foca a sua atividade em todas as etapas da cadeia de valor do medicamento, abrangendo tanto a comercialização de genéricos, como a investigação, desenvolvimento e registo de medicamentos com marca própria. Conta agora com 600 colaboradores e é composto por 18 empresas, dedicando-se essencialmente à produção de formas orais sólidas, tais como comprimidos e cápsulas, e tendo também desenvolvido formulações como filmes orais.¹

Ao longo dos seus 19 anos, abriu delegações em 4 países (Espanha, Angola, Moçambique e EUA) e exportou, em 2018, 87% da sua produção para mais de 40 países, tendo conquistado um enorme prestígio não só a nível nacional como também internacional sendo, atualmente, um dos grupos mais empreendedores e inovadores no setor farmacêutico.¹

A título de curiosidade, em 2003 foi a primeira empresa farmacêutica em Portugal a alcançar conjuntamente as certificações em qualidade (ISO 9001/2001), ambiente (ISO 14001/1999), segurança e saúde ocupacional (OHSAS 18000) e em 2009 obteve a certificação da FDA (*Food and Drug Administration*) para o desenvolvimento e produção de formas sólidas, tornando-se a primeira farmacêutica portuguesa a poder exportá-las para o mercado norte-americano.¹

Futuramente, irá dar início a um dos projetos mais promissores e desafiantes tanto a nível de conhecimento técnico como também científico, que será a produção de injetáveis, enquanto que, a nível de infraestruturas, irá iniciar a construção de uma nova unidade industrial.

Departamento de CQ

O departamento de CQ é constituído por laboratórios devidamente organizados e equipados para a concretização de todos os testes que são necessários para assegurar a qualidade e segurança dos produtos, compreendendo vários setores de trabalho: a Amostragem, as Implementações, a Microbiologia e a Rotina. O departamento de CQ

compreende ainda a equipa da Documentação que revê todos os cálculos/dados, aprova os lotes e emite certificados de análise.

A Amostragem é o setor responsável pela colheita dos produtos que posteriormente irão ser analisados no laboratório, compreendendo as matérias-primas, API (*Active Pharmaceutical Ingredient*), produto acabado e semiacabado e também material de embalagem (primário e secundário). Estas amostras são colhidas tendo em conta a quantidade que é necessária para a realização das análises requeridas, de acordo com procedimentos de amostragem internos e de seguida, registadas em folhas de amostragem. Após este processo, as amostras são enviadas para o laboratório, sendo colocadas no armário de amostras que se encontra ao alcance de todos os analistas, para que sejam realizadas as várias análises.

As Implementações estão incumbidas da implementação de novos métodos de análise que vão ser depois utilizados em rotina, compreendendo o mesmo leque de análises que são realizadas no laboratório de Rotina (LR), executando a validação, verificação e ajuste, caso necessário, dos métodos. Posteriormente, estes métodos são transcritos para um novo AP (*Analytical Procedure*) do produto em questão, de modo a que o LR passe a realizar as análises com base no mesmo.

A Microbiologia é responsável por realizar as análises microbiológicas aos produtos que assim o exigem, sendo que normalmente se realizam este tipo de análises a produtos que tenham uma elevada probabilidade de sofrerem contaminação microbiológica.

No LR são executadas análises às matérias-primas, antes de se proceder à sua produção, ao produto acabado e em *bulk* e ao material de embalagem (primário e secundário), antes deste poder ser comercializado. São várias as análises que se realizam, estando estas descritas em APs que existem especificamente para cada produto, podendo incluir análises por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), GC (*Gas Chromatography*), Karl-Fisher, FTIR (*Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*), perda por secagem, potenciometria, dissolução, entre outras. De notar que, para serem realizadas todas as análises descritas para o produto, este tem que passar por vários analistas, sendo cada um responsável por determinada análise.

Transversalmente aos setores dentro do departamento de CQ encontra-se o laboratório de Dissoluções (LD), o qual integrei durante a maior parte do meu estágio. Cabe a este laboratório realizar os ensaios de dissolução nos produtos que os requerem, podendo ser realizados em lotes de rotina para libertação, bem como também em lotes pilotos para validação.

ANÁLISE SWOT

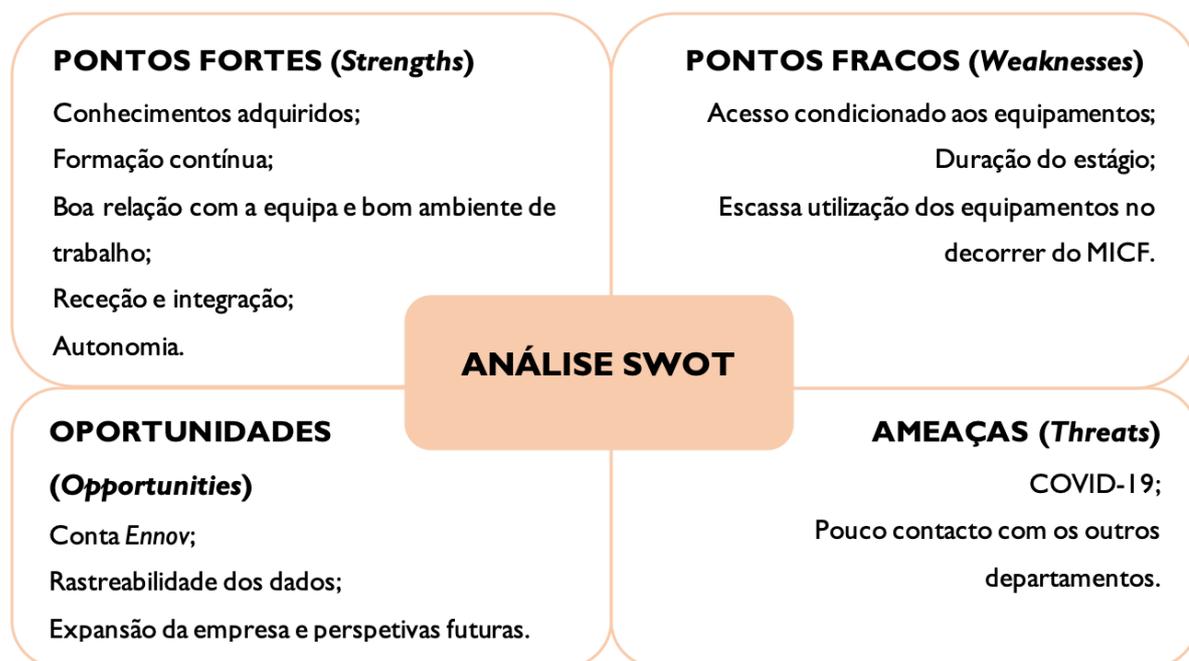


Figura 1: Análise SWOT referente ao estágio curricular na Bluepharma.

PONTOS FORTES

Conhecimentos adquiridos

Ao longo do estágio tive a oportunidade de aprender mais sobre algumas técnicas com as quais já tinha contactado ao longo dos 5 anos do MICF, bem como conhecer novas técnicas. Como já referi, grande parte do meu estágio foi passada no LD e, por isso, vou dar mais ênfase às atividades aqui praticadas.

Os ensaios de dissolução aplicam-se a formas orais sólidas, sistemas transdérmicos e películas orais, necessitando para tal, de um sistema de dissolução (Anexo 1). Um sistema de dissolução pode ser constituído por um aparelho de dissolução (1a), coletor de frações (1b), bomba peristáltica (1c), espectrofotómetro (1d) e computador (1e). O aparelho de dissolução tem como objetivo simular as condições gastrointestinais (pH, temperatura, motilidade) a que as formulações estão sujeitas quando atingem o estômago ou intestino, bem como a mucosa bucal (pH, temperatura, composição química da saliva) no que respeita a formulações de libertação oral. Quanto aos tipos de *apparatus* utilizados no dissolutor, os mais comuns são: cestos (*apparatus 1*), pás (*apparatus 2*) e pás sobre o disco (*apparatus 5*). O dissolutor é constituído por um banho de água onde estão mergulhados 8 vasos, vasos esses onde se vai colocar o meio de dissolução (MD) adequado a cada produto. Apesar de ser constituído por 8 vasos é comum apenas usarem-se os 6 primeiros vasos, no entanto, por vezes utiliza-se o

vaso 7. Isto observa-se na dissolução de produtos em fórmula de cápsula, uma vez que tem que se observar a dissolução da cápsula vazia, como por exemplo na Sertralina.

Atendendo aos ensaios de dissolução podemos ter 3 tipos de colheita: a colheita *online* em que a dissolução depende apenas do equipamento, sendo este responsável por colher e ler (através do UV) as amostras nos tempos que foram previamente definidos na criação de um método de acordo com o AP associado a cada produto; a colheita automática em que o equipamento trata de colher as amostras que podem ser analisadas por espectroscopia UV ou podem ser analisadas por HPLC e, por fim, a colheita manual em que tudo depende do analista, tratando este de colher as amostras para posteriormente se realizarem as devidas análises.

No início de cada semana era enviado um plano com uma escala dos produtos que requeriam ensaios de dissolução. Perante esta escala, programávamos a semana de trabalho de maneira a ser o mais rentável possível. Estando a nossa semana programada, começávamos por analisar os diários dos lotes, o AP e a Especificação (SPEC) pertencente ao produto. Desta análise retirávamos aspetos que eram essenciais para o ensaio de dissolução tais como, o tipo de colheita (manual, automática ou *online*), o tipo de *apparatus* e as rotações, os tempos de colheita e o volume a colher (com ou sem reposição), tendo em conta os filtros a serem utilizados, o modo de preparação e qual o MD e o volume necessário em cada vaso, entre outros parâmetros.

A título de exemplo, quando tínhamos que realizar dissolução de Lamotrigina (antiepilético), começávamos por analisar os diários e os procedimentos de modo a reter a informação necessária para o preenchimento da folha de colheita, uma vez que a sua dissolução era uma colheita manual. Iniciávamos a preparação do MD (HCl 0,1N), de acordo com o que se encontrava descrito no AP. Posteriormente colocávamos este meio a aquecer num banho de água em 6 copos, cada um com 900 mL de meio, uma vez que o mesmo tinha que estar a uma determinada temperatura (também ela especificada AP). Preparávamos também o nosso material de bancada com 12 seringas, 6 para a colheita da amostra em cada vaso e as restantes para reposição do volume. A colheita deste produto era realizada através da utilização de uma cânula e, posteriormente, as amostras eram filtradas para tubos de ensaio devidamente identificados para prosseguirem para o laboratório de rotina, uma vez que este produto era analisado por HPLC. Após o meio estar à temperatura ideal este era colocado nos vasos do dissolutor e dava-se início à dissolução, estipulando antecipadamente as condições para o ensaio (rotações, temperatura do banho do dissolutor, temperatura do MD e volume em cada vaso). Os comprimidos eram adicionados manualmente e com intervalos de 30 segundos em cada vaso para se proceder à colheita nos tempos estipulados pelo AP.

No caso do Febuxostato (tratamento de gota) a análise era diferente, uma vez que a dissolução era uma colheita automática. Reuníamos as informações essenciais do AP e iniciávamos a preparação do MD (Tampão Fosfato 0,05M pH 6,8), posteriormente este era colocado a aquecer. Como nesta colheita o equipamento era responsável por colher a amostra, tínhamos que colocar os filtros de dissolução na cânula de colheita (Anexo II) presente no aparelho de dissolução. Após estar à temperatura adequada, o meio era colocado nos vasos e no computador era aberto o método específico para o ensaio (com todas as condições estipuladas). Enquanto decorria a análise, o dissolutor colhia para o coletor a amostra durante os devidos tempos (5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos) e era altura de preparar o padrão correspondente para a análise por espectroscopia UV. Este padrão era preparado de acordo com o AP, e quando da sua análise este deveria compreender determinados valores de absorvância, tendo em conta a linearidade existente para este produto. Estando a dissolução concluída, as amostras colhidas eram então analisadas e no decorrer da leitura por UV, a leitura do padrão era feita a cada tempo de colheita, garantindo através de uma folha de *System Suitability*, que o produto cumpria todas as especificações e que as absorvâncias das amostras não se encontravam comprometidas. Posteriormente preenchíamos a folha de cálculo, onde introduzíamos as massas dos comprimidos, as absorvâncias obtidas e todos os parâmetros da dissolução, a fim de se obter um perfil de dissolução do produto e concluir se cumpria a percentagem dissolvida, considerando a quantidade de substância ativa dissolvida no tempo de especificação presente no procedimento. Após o preenchimento e impressão da folha de cálculo e do *System Suitability*, estes documentos eram então anexados ao diário dos lotes para posterior revisão.

No decorrer do estágio várias foram as análises que pude presenciar. Quanto à técnica de HPLC foi-me possível observar a análise de conteúdo, de impurezas e UDU (*Uniformity of Dosage Unit*) de lotes de Vildagliptina, sendo que também pude assistir à determinação de água por Karl-Fischer e análise estrutural por FTIR deste mesmo produto. Quanto à técnica de GC apenas observei análise de solventes residuais de Ivermectina no âmbito de uma implementação.

Formação contínua

A Bluepharma desde início que proporcionou aos seus estagiários inúmeras formações (Tabela I), formações essas que foram, sem quaisquer dúvidas, uma ferramenta essencial e um dos principais pontos fortes do meu estágio.

Inicialmente, as formações eram transversais a todos os departamentos, com o objetivo de dar a conhecer um pouco sobre a política da empresa e o funcionamento desta. Posteriormente, as formações direcionaram-se mais para o departamento de CQ, o que me permitiu consolidar conhecimentos adquiridos ao longo dos 5 anos de MICF e também obter novos conhecimentos.

Tabela I: Formações proporcionadas pela Bluepharma.

Formações	
Regras de Indústria Farmacêutica e Procedimentos Laboratoriais	Sistema de Gestão Integrado: Investigação, Desenvolvimento e Inovação
Ambiente, Saúde e Segurança no Trabalho	GMP
Ennov Doc e Process	Ensaio de Dissolução
Melhoria Contínua	Aprovisionamento de Materiais
Boas Práticas de Pesagem	Validação de Métodos Analíticos
Trabalho em Sistema de Contenção	Documentação Analítica
Assuntos Regulamentares	Farmacovigilância

Boa relação com a equipa e bom ambiente de trabalho

A equipa do CQ é caracterizada por ser jovem, com grande espírito de união, de amizade e mais importante, com uma enorme capacidade de se entretajar. Estas características permitiram-me desde logo ser muito bem integrada na equipa e desenvolver uma boa dinâmica de trabalho, num excelente ambiente profissional.

Receção e integração

No primeiro dia de estágio, todos os estagiários foram recebidos pela equipa dos Recursos Humanos, na sede da Bluepharma. De seguida foi feita uma pequena visita por todos os departamentos, onde tivemos a oportunidade de nos apresentarmos individualmente. Aquando desta apresentação, todos os colaboradores nos receberam com mensagens de boas-vindas e incentivo para este nosso novo desafio. Posteriormente fui encaminhada para o departamento do CQ, onde fui muito bem recebida e no qual toda a equipa se disponibilizou prontamente a auxiliar-me em tudo o que eu necessitasse.

Autonomia

Desde o início do estágio que acompanhei sempre um colaborador. Colaborador esse que era responsável por me explicar tudo sobre o que era realizado no departamento, de modo a que eu pudesse reter conhecimentos e capacidades para realizar as diversas atividades necessárias. Após a apreensão dos conhecimentos, foi-me concedida autonomia para a realização de diversas análises, o que me permitiu colocar em prática todos os conhecimentos que ia adquirindo ao longo dos dias. Se o estágio tivesse sido apenas observacional não teria sido tão benéfico, uma vez que há dúvidas que apenas surgem aquando da realização do trabalho laboratorial. Com o decorrer do estágio fui aprimorando as minhas capacidades e fui realizando tarefas cada vez mais complexas, o que me permitiu ter uma maior confiança e sentir que o meu trabalho estava a ser útil.

PONTOS FRACOS

Acesso condicionado aos equipamentos

Tendo em conta o trabalho que é realizado diariamente e o número de pessoas que fazem uso do laboratório, o número de equipamentos é reduzido. O LD estava em constante coordenação com o Desenvolvimento Analítico e Galénico (DAG) e com as Estabilidades de modo a ser organizada a utilização dos dissolutores, uma vez que havia ensaios de dissolução de determinados fármacos que não podiam ser realizados nos dissolutores do LD, mas podiam ser realizados nos equipamentos do DAG ou das Estabilidades. Outro ponto, era a espera para se poder utilizar tanto as balanças, como o medidor de pH, que estavam frequentemente a serem utilizados. Assim, era perdido tempo que poderia ser útil para a realização de outras tarefas.

Duração do estágio

O estágio realizado tem a duração de 3 meses, tempo que é acordado entre a FFUC e a Bluepharma. Ainda que este período pareça extenso e nos permita adquirir autonomia e inúmeras capacidades, é necessário referir que este se torna curto devido aos numerosos métodos e técnicas que estão inerentes à análise dos produtos farmacêuticos, assim como a enorme variedade de produtos que a Bluepharma produz. Face a isto, há necessidade de mais tempo para que haja a devida orientação e interiorização dos processos realizados neste departamento.

Escassa utilização dos equipamentos no decorrer do MICF

Ainda que durante os 5 anos de MICF tenhamos diversas unidades curriculares que proporcionam o contacto com variados equipamentos de laboratório, tais como Química Orgânica e Métodos Instrumentais de Análise, o elevado número de estudantes presentes nas aulas praticamente anula a possibilidade de os estudantes poderem utilizar os equipamentos. Assim, apesar de termos conhecimento sobre o fundamento teórico, a experiência em termos práticos é bastante reduzida.

OPORTUNIDADES

Conta Ennov

O *Ennov* é uma plataforma onde são inseridos SOPs (*Standard Operating Procedure*) e APs inerentes aos produtos que são analisados na Bluepharma, assim como as folhas de preparação de soluções, as de verificação dos parâmetros diários e os FIR (*Failure Investigation Report*). Nesta plataforma estão as versões mais recentes dos documentos e podem ser consultadas por todos os colaboradores, de forma a garantir que as análises são realizadas tendo em conta as informações mais atualizadas.

Rastreabilidade dos dados

Na Bluepharma é necessário que todos os ensaios sejam meticulosamente realizados de acordo com os APs e para que os passos dos ensaios possam ser recriados é necessário registar tudo o que foi feito, pois se não está escrito não foi feito. Para tal, cada equipamento é provido de um *logbook* onde se registam quais as análises feitas, em que produto e a que horas estas foram realizadas e a assinatura do colaborador responsável pelas mesmas. A título do exemplo, no medidor de pH tínhamos que colocar se era apenas uma verificação de pH ou se era um acerto e verificação de pH, enquanto que na centrífuga tínhamos que discriminar as rotações por minuto e o tempo de duração das mesmas.

Expansão da empresa e perspetivas futuras

Sendo a Bluepharma uma empresa em crescimento exponencial, é de esperar que cada vez mais esta necessite de novos colaboradores para assegurar as atividades que a mesma realiza. Uma vez que as instalações atuais já não são suficientes e num futuro próximo a empresa irá proceder à construção de uma nova unidade, como referido anteriormente, e

estando eu prestes a concluir o MICF é de que considerar que esta ampliação pode representar uma oportunidade para a minha futura vida profissional.

AMEAÇAS

COVID-19

Quando surgiram os primeiros casos de COVID-19 em Portugal, os estagiários que estavam em escritório foram mandados para casa para realizar teletrabalho. No dia 13 de março fui mandada para casa e, uma vez que o meu estágio era em laboratório (trabalho de bancada) não houve possibilidade de eu realizar teletrabalho, pelo que dei por terminado o meu estágio nesse dia. Considero então o COVID-19 como uma ameaça porque me obrigou a terminar precocemente o meu estágio, justamente quando já estava completamente autónoma e impossibilitando-me também de conseguir observar outras técnicas que até então não tinha tido a possibilidade de acompanhar.

Pouco contacto com os outros departamentos

Apesar de ter tido a oportunidade de acompanhar um dia na Garantia de Qualidade (GQ) e ter ido à Amostragem e à Microbiologia, onde me foi explicado em que consistiam estes 3 setores, o estágio focou-se maioritariamente no CQ. É de compreender que de outra forma não poderia ter adquirido os conhecimentos que adquirir no departamento no qual fui integrada. No entanto, gostava de ter tido mais contacto com os outros departamentos de modo a conseguir compreender tudo o que está inerente ao produto, desde a sua produção até à libertação do mesmo.

APRECIÇÕES FINAIS

Com a conclusão do estágio na Bluepharma, é de referir que este foi bastante benéfico e me proporcionou o contacto próximo com a realidade que é a IF. Este estágio permitiu-me também adquirir bastantes conhecimentos e ganhar destreza para a realização das mais diversas atividades, desenvolvendo tanto as minhas competências profissionais, como também as competências pessoais.

Relativamente ao departamento de CQ, este é fundamental para a realização de todas as análises que atestam a qualidade do produto e indispensável para qualquer IF, pelo que foi um enorme orgulho poder ter integrado esta equipa e compreender tudo o que lhe está associado.

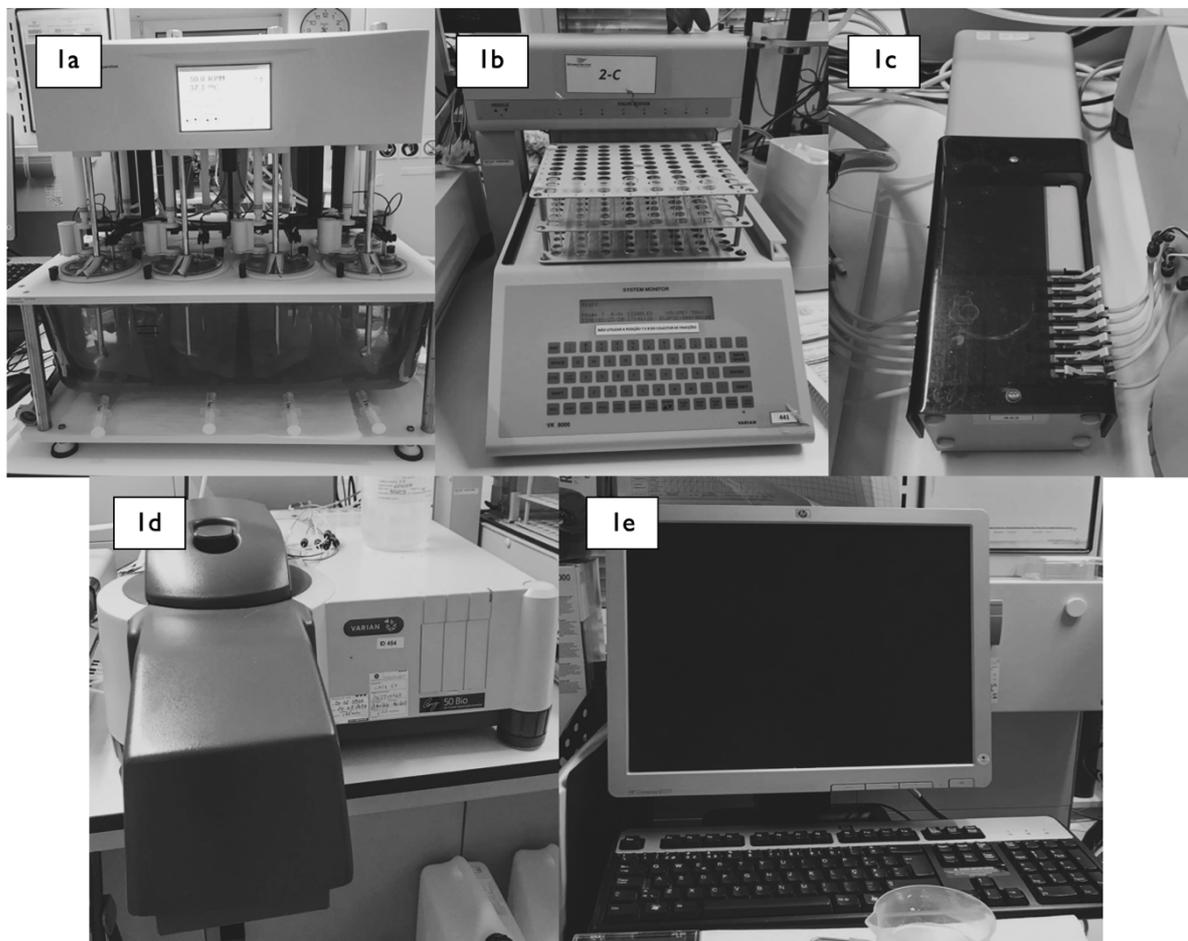
Para terminar, é importante referir que a FFUC prepara de forma excelente os estudantes para a entrada no mercado de trabalho, oferecendo ainda a possibilidade de realização de estágios em diversas áreas, tais como IF, Farmácia Hospitalar e Farmácia Comunitária. O que é bastante benéfico, uma vez que nos permite ter uma visão alargada sobre o que o MICF nos pode proporcionar futuramente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

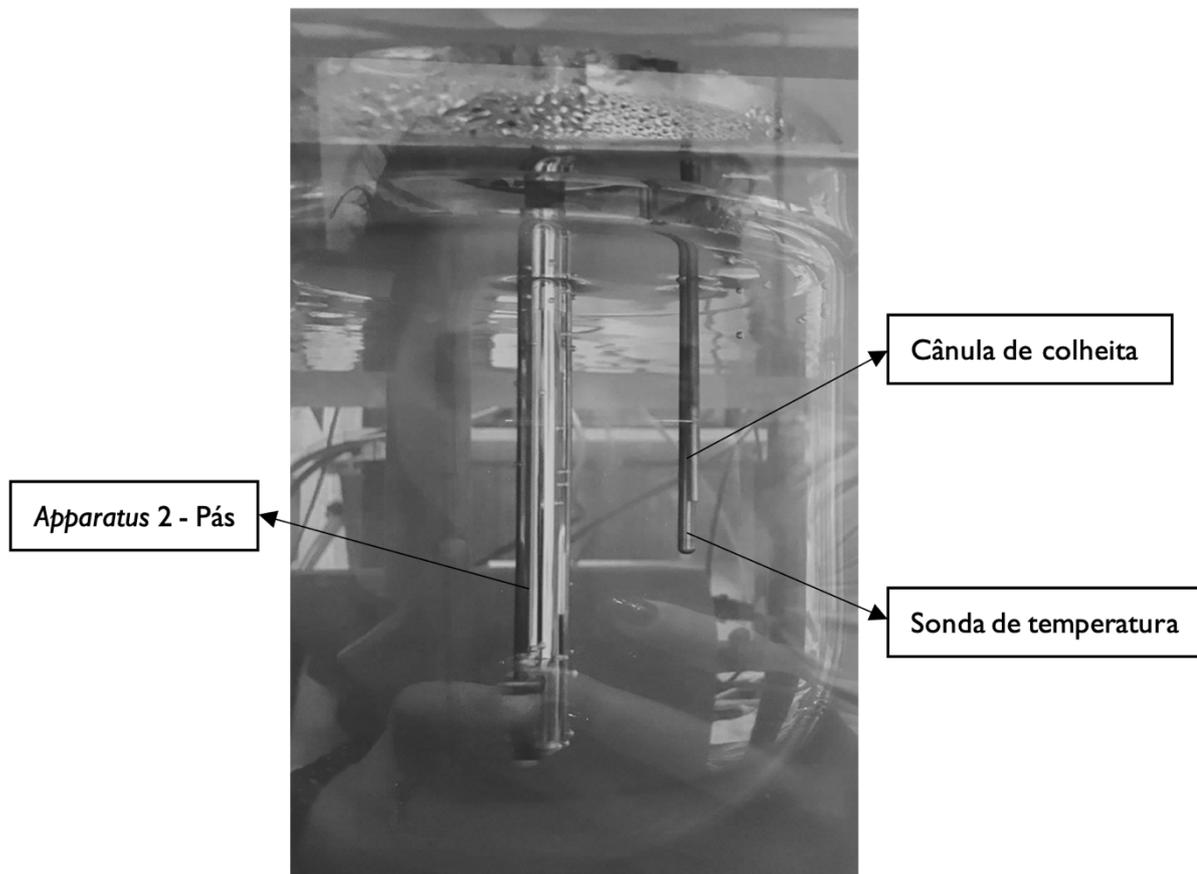
- I. BLUEPHARMA – **Quem somos/Bluepharma**. Disponível em: <https://www.bluepharma.pt>

ANEXOS

Anexo I: Sistema de dissolução.



Anexo II: Cânula de colheita e sonda de temperatura de um dissolutor.



CAPÍTULO II

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA

Farmácia Pátria

LISBOA



**FARMÁCIA
PÁTRIA**

Sob a orientação da
Dra. Dina Sofia de Freitas Gonçalves Simões

LISTA DE ABREVIATURAS

DCI	Denominação Comum Internacional
FP	Farmácia Pátria
MICF	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
MNSRM	Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica
PIM	Preparação Individualizada de Medicação
SNS	Serviço Nacional de Saúde
SWOT	<i>Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats</i>

INTRODUÇÃO

O estágio curricular em farmácia comunitária é de carácter obrigatório para os alunos do último ano do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) e tem como objetivo consolidar todos os conhecimentos adquiridos ao longo dos 5 anos, assim como preparar-nos para a vida profissional, algo que nos é praticamente desconhecido até então.

Muitas vezes o farmacêutico é o profissional de saúde a quem os utentes recorrem em primeira instância, sendo depositada enorme confiança no mesmo, o que revela o grande valor da atividade farmacêutica. Por isso, reveste-se de enorme importância a realização deste estágio para que nós, futuros farmacêuticos, possamos desenvolver competências essenciais para o dia-a-dia do farmacêutico no âmbito de farmácia comunitária, tais como a comunicação e relação com o utente.

Durante o período de 4 de maio a 20 de agosto de 2020, decidi realizar este estágio na Farmácia Pátria (FP), farmácia onde já tinha realizado o meu estágio de verão. A FP com cerca de 60 anos de história localiza-se em Campolide, uma zona de habitação e também muito procurada pelos turistas devido à sua proximidade a locais de grande interesse.

Este relatório compreende uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities e Threats*), onde me irei debruçar sobre os Pontos Fortes, os Pontos Fracos, as Oportunidades e, por fim as Ameaças, detetadas ao longo do meu estágio.

ANÁLISE SWOT

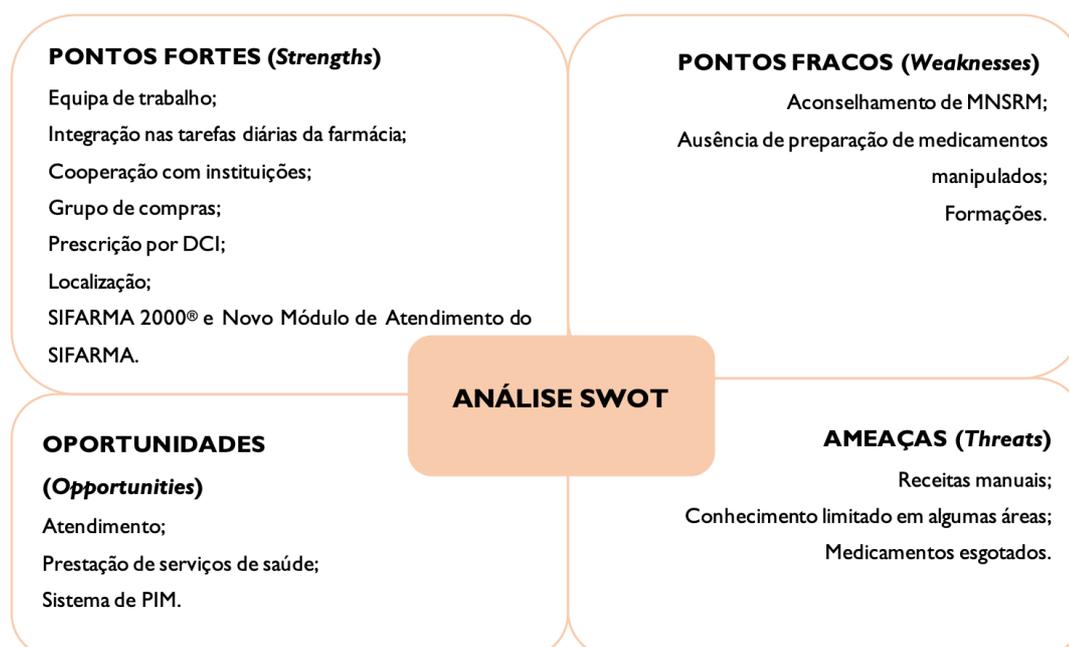


Figura 1: Análise SWOT referente ao estágio curricular na Farmácia Pátria.

PONTOS FORTES

Equipa de trabalho

A FP pelos seus muitos anos de história apresenta-se como uma farmácia de índole familiar e caracteriza-se pelo seu carácter moderno com uma equipa jovial e empreendedora, sendo constituída por 2 farmacêuticas, a Dra. Dina Sofia Simões, que assume o cargo de Diretora Técnica, a Dra. Ana Eleutério, Farmacêutica Substituta; e, por fim, a Sra. Tânia Simões Pereira, Técnica de Farmácia.

Devido à constante prontidão e disponibilidade da equipa para comigo naquilo que eu precisasse, desde logo me senti integrada e confortável para esclarecer qualquer dúvida que surgisse e até fazer sugestões, o que contribuiu para uma rápida e fácil adaptação. Esta equipa é também extremamente focada e competente e tem em consideração que o principal foco é o aconselhamento e satisfação das necessidades dos utentes, tendo como preocupação a escuta do utente, o esclarecimento das suas dúvidas (por exemplo, se sabe como se faz a medicação e para que serve a mesma) e a satisfação do mesmo. Todos estes factos, contribuíram para que eu, ao longo do estágio, me fosse interessando cada vez mais por esta área e me sentisse realizada ao saber que sempre tentei dar o meu melhor para corresponder às expectativas dos utentes.

Em suma, penso que esta equipa contribuiu para que desde logo me sentisse à vontade e como parte da equipa, permitindo-me consolidar o meu conhecimento, desenvolver as minhas capacidades e o meu espírito de equipa.

Integração nas tarefas diárias da farmácia

Desde o primeiro dia de estágio que me foi concedida bastante autonomia, sendo integrada nas tarefas diárias da farmácia e podendo acompanhar todas as funções desempenhadas no dia-a-dia, o que me permitiu desenvolver sentido de responsabilidade na realização das tarefas que me eram atribuídas.

A enorme confiança depositada em mim e o ensino construtivo oferecido pela equipa contribuiu para o desenvolvimento das minhas capacidades e aproximação das minhas funções às da restante equipa. Com o passar do tempo, comecei a realizar todo o tipo de tarefas com o devido acompanhamento, quer fosse a abertura ou fecho da farmácia, a realização das encomendas diárias, a preparação de solução desinfetante, o envio do receituário no fim de cada mês, o envio dos documentos referentes aos medicamentos psicotrópicos e o fecho da caixa, permitindo-me sentir útil e que estava a desempenhar um bom trabalho.

Ainda relativamente ao ensino, sempre que cometia algum erro, a abordagem era de tentar perceber de onde vinha o erro e de que maneira o podia corrigir e futuramente evitar, o que fez com que consolidasse de forma mais rápida determinados conceitos e com que tivesse confiança em mim mesma aquando do desempenho das minhas funções.

Assim, acho que a minha inserção na FP foi bastante vantajosa e fez com que me tornasse mais autónoma e responsável. Capacidades estas que me serão muito úteis no futuro.

Cooperação com instituições

A FP tem protocolo com um lar de idosos, a Associação Infanta Dona Mafalda. Esta colaboração é extremamente importante, principalmente a nível económico uma vez que tem um enorme peso no volume mensal de vendas.

O processamento desta instituição foi-me muitas vezes atribuído. Todos os utentes do lar possuíam uma ficha de utente com os seus dados, de modo a termos acesso à medicação usual de cada um e com uma conta-corrente, permitindo colocar as vendas a crédito. Aquando do processamento desta instituição consultava a ficha do utente para verificar quais os medicamentos consumidos por este e realizava uma venda a crédito. No final do mês era necessária a regularização da conta-corrente de cada utente, sendo que em todos os finais de meses era enviado por *e-mail*, através do SIFARMA 2000®, o extrato de cada utente para os devidos responsáveis. Também em algumas ocasiões nos eram pedidos medicamentos sem envio da respetiva receita médica, sendo efetuada uma venda suspensa, para posterior regularização aquando do envio da prescrição médica.

Grupo de compras

Muitos são os fatores que colocam em risco a sustentabilidade de uma farmácia, nomeadamente as margens regressivas implementadas pelo Governo e presentes na comercialização dos medicamentos. Face a esta situação muitas farmácias, incluindo a FP, criaram aquilo que se designa grupo de compras, onde as farmácias conseguem ter acesso a regalias, nomeadamente descontos na aquisição de determinados produtos que fazem parte do *stock* da farmácia. Isto permite que a farmácia consiga obter maiores margens na compra e venda desses mesmos produtos.

Contudo, a farmácia tem sempre que ter como objetivo a satisfação das necessidades do utente. No entanto, é também essencial saber gerir o volume de compras da farmácia, evitando a perda de produtos por expiração do prazo de validade devido ao reduzido escoamento e também a perda de vendas devido a rutura de *stock*. Para que tal não aconteça

é de extrema importância que a farmácia conheça o seu público-alvo e as suas necessidades e que saiba em que alturas do ano são necessários reforços de determinado produto, permitindo que se saiba quais são os produtos que irão originar um maior número de vendas e aqueles que, pelo contrário, não irão dar retorno financeiro à farmácia.

Por sua vez, é importante referir que muitas vezes o aumento do volume de compras traz benesses à farmácia, tais como descontos ou bonificações por parte dos laboratórios ou armazenistas, sendo de extrema importância a escolha dos fornecedores. Desta forma, é essencial que haja uma boa gestão para que a farmácia se mantenha sustentável e consiga satisfazer as necessidades de procura dos utentes.

Assim, considero que estas noções foram um dos pontos fortes do meu estágio, uma vez que me permitiram ter uma visão mais alargada neste campo e também fortalecer o meu conhecimento acerca das políticas económicas no Setor Farmacêutico.

Prescrição por Denominação Comum Internacional (DCI)

Como ao longo do meu percurso académico o objetivo de estudo sempre foram os princípios ativos e não os nomes comerciais dos medicamentos, a prescrição por DCI foi essencial para mim durante os atendimentos realizados no decorrer do estágio. A prescrição por DCI dá ao utente a liberdade de escolher os medicamentos que cumpram a prescrição do médico, promovendo assim a utilização de medicamentos genéricos (sempre que possível) e também uma escolha racional e económica por parte do utente. Quanto a mim, a prescrição por DCI permitiu que eu fosse adquirindo conhecimentos sobre os nomes comerciais de muitos princípios ativos e os diversos laboratórios que os produziam, assim como se tornou muito mais fácil a associação destes princípios ativos ao seu respetivo nome comercial.

Localização

Apesar das suas pequenas dimensões, a FP apresenta elevado movimento, visto localizar-se numa região próxima de locais bastante frequentados, tanto por habitantes como por turistas, nomeadamente o Parque Eduardo VII, o centro Comercial Amoreiras, o *El Corte Inglés* e o Aqueduto das Águas Livres. Outra razão para este elevado movimento, é também o facto de se localizar numa zona onde para além de existirem várias famílias com crianças (que muitas vezes necessitam produtos de puericultura e até medicação), também existe uma elevada população idosa que frequentemente necessita de se deslocar à farmácia, quer para obtenção de medicação, como também para medição de certos parâmetros bioquímicos (colesterol, glicémia, tensão arterial) e até esclarecimento de dúvidas que lhes possam surgir.

SIFARMA 2000® e Novo Módulo de Atendimento do SIFARMA

Durante todo o meu estágio tive contacto tanto com o SIFARMA 2000® como com o Novo Módulo de Atendimento do SIFARMA, o que me permitiu muitas vezes utilizar ambos em simultâneo, representado assim um enorme ponto forte durante os atendimentos. No entanto, na maioria das vezes era o Novo Módulo de Atendimento que era utilizado.

O Novo Módulo de Atendimento é muito mais intuitivo que o SIFARMA 2000®, porém, ainda há muitas funções que apenas se podem realizar no SIFARMA 2000®, tais como as encomendas diárias, as vendas suspensas, consulta e somatório de vendas, dispensa de medicação hospitalar, consulta do histórico dos utentes e gestão dos prazos de validade.

Vários eram os idosos que não regularmente à FP e que apresentavam já um histórico de compras na sua ficha, sendo já conhecidos pela equipa (que é a mesma há vários anos) e sabendo esta a maioria dos medicamentos que cada cliente habitual faz. Assim, sempre que realizava um atendimento onde, devido ao carácter familiar que a farmácia apresenta, me era pedido o “medicamento que tomo para a tensão” ou “aquele medicamento que tomo para as dores” ou quando era necessário dispensar uma prescrição, acedia sempre ao SIFARMA 2000® para conseguir obter a informação necessária para o atendimento do utente, tais como os laboratórios que costuma comprar. Posteriormente, realizava a venda no Novo Módulo de Atendimento.

Posto isto, o acesso a estas 2 modalidades permitiu-me ficar à vontade sempre que fosse necessário utilizar um ou outro, permitiu-me também memorizar quais os medicamentos que cada utente daquela farmácia faz e também as suas preferências e necessidades, culminando numa melhor postura e assertividade da minha parte ao longo do estágio e durante os atendimentos.

PONTOS FRACOS

Aconselhamento de Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM)

No decorrer do estágio foram algumas as dificuldades que senti relativamente ao aconselhamento de MNSRM. Apesar de ser extremamente importante conhecer os vários grupos farmacológicos, os respetivos mecanismos de ação, as funções e interações dos Medicamentos Sujeitos a Receita Médica (MSRM), considero que há, da minha parte, um conhecimento limitado dos MNSRM.

É importante referir que há um aumento crescente da automedicação e é crucial estarmos cientes desta realidade. Sendo muitas vezes a farmácia o primeiro local a que os utentes recorrem para resolver situações menores (de modo a evitar as filas nos hospitais e pagamentos de taxas) é importante termos um conhecimento mais aprofundado relativamente aos MNSRM e considerando sempre que necessário o reencaminhamento para o médico, uma vez que não é possível por parte do farmacêutico a alteração da terapêutica instituída pelo médico.

Ausência de preparação de medicamentos manipulados

Durante o estágio na FP não me foi possível observar ou preparar medicamentos manipulados. Sendo que tanto o conhecimento, como a prática relativamente à preparação de medicamentos manipulados é de extrema importância e também uma mais-valia para o farmacêutico, era do meu interesse ter podido observar ou proceder à preparação de manipulados, considerando então este como um dos pontos fracos do meu estágio.

Formações

No decorrer dos cerca de 4 meses de estágio também não tive oportunidade de participar em formações, o que teria sido essencial principalmente a nível de aconselhamento de produtos de dermocosmética, puericultura e alimentação infantil, uma vez que são as áreas que se apresentam como um desafio para mim. Ainda assim, tive a oportunidade de assistir a pequenas sessões de esclarecimento sobre produtos já presentes na farmácia e também apresentação de novos produtos por parte dos delegados de informação médica.

OPORTUNIDADES

Atendimento

Desde o primeiro dia de estágio que foi depositada em mim uma enorme confiança, uma vez que já tinha realizado o meu estágio de verão nesta farmácia. Para além da receção das encomendas e posterior arrumação, tive também o privilégio de poder assistir e até participar nos atendimentos, o que para mim foi uma mais-valia. A meu ver, ao poder assistir sempre aos atendimentos e também participar neles, permitiu-me melhorar as minhas capacidades de utilizar o SIFARMA 2000® e também o Novo Módulo de Atendimento.

Com este ensino mais prático, rapidamente me senti à vontade quanto à utilização do programa e ganhei autonomia, começando a realizar atendimentos e a desempenhar funções

tal como se fosse uma colaboradora daquela farmácia, o que contribuiu para que eu me tornasse mais responsável, confiante, fez com que me sentisse prestável e que o meu trabalho estava a ser reconhecido.

Prestação de serviços de saúde

A farmácia comunitária tem vindo a ganhar cada vez mais um papel essencial na promoção da saúde e bem-estar na comunidade, não só apenas no que concerne à dispensa de medicamentos, como também na prestação de cuidados de saúde.

A FP dispõe de vários serviços de saúde que têm como foco principal o utente, tais como a medição da tensão arterial, da glicémia, do peso corporal, do índice de massa corporal, do colesterol e também administração de injetáveis. Esta prestação de serviços contribui para o controlo de patologias previamente existentes e possibilita muitas vezes, a deteção de certas patologias que afetam de um modo crescente a população.

A prestação de muitos destes cuidados de saúde, com exceção da administração de injetáveis devido a ausência de formação permitiu-me, apesar do COVID-19, desenvolver uma relação de proximidade com os utentes, aprender a ouvi-los e também aconselhá-los sempre que necessário.

Sistema de Preparação Individualizada de Medicação (PIM)

Cada vez há mais idosos que se encontram a viver sozinhos ou que não têm ninguém que cuide deles, o que muitas vezes leva a que estes não façam a medicação ou que a façam de forma errada. De modo a prevenir estas situações, a FP dá ao utente a possibilidade da preparação da sua medicação semanalmente, evitando-se erros associados à sua toma, tais como dosagens erradas e esquecimentos. Todas as segundas-feiras os utentes traziam-nos a caixa organizadora de comprimidos composta por pequenas caixas de comprimidos para cada dia da semana e com 5 divisões para as tomas diárias (pequeno-almoço, almoço, jantar, deitar e especial). Com base numa tabela com a medicação do utente era colocada a medicação realizada pelo utente em cada dia da semana e agrupada de acordo com o momento da toma.

Este sistema de PIM contribui para uma melhoria notória na saúde dos utentes, uma vez que quando a farmácia assume a gestão da medicação destes, são evitados inúmeros erros associados à toma da medicação.

AMEAÇAS

Receitas manuais

As receitas manuais apesar de escassas continuam a ser utilizadas em determinadas situações, nomeadamente quando ocorre falência informática, inadaptação do prescriptor, prescrição no domicílio ou até um limite de 40 receitas por mês.

Em comparação com as prescrições eletrónicas que se apresentam como o formato mais comum das prescrições médicas, as receitas manuais exigem um cuidado redobrado no momento da dispensa, visto existirem várias normas de preenchimento que o farmacêutico tem que confirmar que foram cumpridas, nomeadamente:

- a) Nome e número do utente;
- b) Preenchimento da exceção que justifica a prescrição manual;
- c) Data de validade da prescrição (30 dias);
- d) Vinheta identificativa do médico prescriptor;
- e) Local de prescrição ou respetiva vinheta, se aplicável;
- f) Assinatura do médico prescriptor;
- g) Em cada prescrição manual só podem ser prescritos no máximo, quatro medicamentos distintos (total de quatro embalagens por prescrição);
- h) Só podem ser prescritas duas embalagens por medicamentos, com exceção dos medicamentos unitários, em que podem ser prescritas até quatro embalagens;
- i) Ausência de rasuras e caligrafias e cor de caneta distintas.

Sempre que se verifique o incumprimento de algum destes requisitos, por norma a receita não pode ser dispensada, uma vez que esta situação coloca em causa a veracidade da receita em termos de comparticipação para o utente e também a nível de reembolso para a farmácia.

As receitas manuais apresentam ainda outras 3 desvantagens: a caligrafia do médico prescriptor que muitas vezes é difícil de perceber, colocando em causa a perceção do medicamento prescrito; o facto de os utentes terem que levar todos os medicamentos prescritos, visto que posteriormente esta receita não pode voltar a ser utilizada; e a aplicação dos planos de comparticipação [como por exemplo o 01 para o Serviço Nacional de Saúde (SNS), o 48 para o SNS + Pensionistas e o 49 para o SNS + Pensionistas com Portaria], o que muitas vezes leva a que se cometam erros no momento da dispensa.

Assim, as prescrições eletrónicas são uma vantagem no momento do atendimento, pois assim que introduzimos o número da receita e o código de dispensa os dados são inseridos automaticamente no programa, reduzindo a execução de erros. Estas prescrições apresentam também uma maior validade (com exceção de alguns medicamentos que apenas apresentam 30 dias de validade) e tornam-se mais práticas pois não há obrigação por parte do utente de levar todas as embalagens prescritas, podendo ir comprando conforme a necessidade.

Deste modo, as receitas manuais surgem como uma ameaça, pois como são menos utilizadas há uma maior probabilidade de serem cometidos enganos aquando da sua dispensa. Além disso há necessidade do envio mensal do receituário, sendo que sempre que é detetada alguma falha nos requisitos para validação da receita, a farmácia perde o respetivo reembolso.

Conhecimento limitado em algumas áreas

Apesar do MICF ser um curso extremamente completo e abrangente, existem temas que não são aprofundados com muito detalhe, tais como dermocosmética, suplementação alimentar, produtos de ortopedia e medicamentos de uso veterinário, sendo a dermocosmética a área que, sem dúvida, foi para mim um desafio. O facto de apenas termos uma unidade curricular sobre este tema durante os 5 anos de MICF (Dermofarmácia e Cosmética) é bastante limitante, pois sendo este tema bastante vasto é praticamente impossível ser-nos apresentado na íntegra. É importante ressaltar que nos foram fornecidas as bases teóricas essenciais e, visto que esta área está constantemente a evoluir, cabe-nos a nós realizar trabalho de pesquisa com o objetivo de aprofundar os conhecimentos adquiridos e também estar sempre a par dos novos produtos que vão surgindo no mercado.

Medicamentos esgotados

Várias são as alterações que o setor Farmacêutico tem sofrido ao longo do tempo, nomeadamente a diminuição do preço dos medicamentos em Portugal, havendo um aumento da disparidade entre os preços praticados em Portugal e na restante Europa.

Assim, inúmeras empresas Farmacêuticas optam por exportar os medicamentos para países europeus onde os preços são superiores, o que conduz a um racionamento dos medicamentos fornecidos a Portugal, levando muitas vezes a ruturas de *stock* destes medicamentos.

Também os armazéns grossistas optam, muitas vezes, por exportar uma percentagem destes medicamentos para outros países, obtendo uma maior margem de lucro. Sendo que

em Portugal dão preferência às farmácias que apresentam maior faturação e rateiam o fornecimento de medicamentos às farmácias cuja faturação é menor.

Esta situação dificulta o acesso aos medicamentos por parte da farmácia e também dos utentes, apresentando-se como um desafio para a equipa técnica, pois muitas vezes os utentes não entendem a situação. Cabe então à equipa trabalhar no sentido de explicar de forma clara a situação ao utente, de modo a que este a compreenda e se acalme. Também muitas vezes é necessário que o farmacêutico estabeleça contacto com o médico no sentido de se conseguir arranjar uma alternativa terapêutica, se possível, assegurando-se a continuação da terapêutica por parte do utente.

CASO PRÁTICO

Uma utente com cerca de 35 anos dirige-se à FP pedindo algo para o *stress*/ansiedade e que a ajudasse a dormir, mas que não criasse habituação. Na sequência do atendimento tentei obter mais informações de modo a conseguir saber qual a causa dos sintomas referidos pela utente. A utente era advogada e com a pandemia do COVID-19 ficou em teletrabalho durante 2 meses, que a levou a acumular muito trabalho e, conseqüentemente, ao aumento da sua ansiedade, fazendo com que a mesma não conseguisse nem dormir, nem trabalhar. Perante esta situação aconselhei a toma do Melamil Tripto[®] (4 gotas, 30 minutos antes de se deitar) que é um suplemento alimentar à base de melatonina, triptofano e vitamina B6 indicado para a obtenção de um sono calmo e revigorante em momentos de *stress*. A melatonina é uma hormona segregada pela glândula pineal e responsável pela regulação dos ciclos circadiano e do sono, o triptofano é um aminoácido essencial que atua como precursor da melatonina e a vitamina B6 participa em numerosos processos metabólicos que visam a obtenção de energia (metabolismo de proteínas, hidratos de carbonos e lípidos), contribuindo assim para a diminuição da fadiga e do cansaço.

APRECIÇÕES FINAIS

O farmacêutico, como agente de saúde pública, cada vez mais está a ter o reconhecimento de que é merecedor no que concerne às mais variadas funções, tais como promoção do correto uso da medicação, de estilos de vida saudáveis, deteção precoce de patologias, determinação de parâmetros, aconselhamento e acompanhamento terapêutico.

O estágio em farmácia comunitária sem dúvida que contribuiu para que ganhasse consciência da importância do farmacêutico nos dias de hoje para os utentes e das inúmeras

funções que o mesmo tem no dia-a-dia, uma vez que muitas vezes o farmacêutico é erradamente descrito como “vendedor de medicamentos”.

Assim, este estágio foi indispensável para mim, tanto a nível de aquisição de conhecimentos, como também a nível interpessoal, uma vez que adquiri várias ferramentas que me permitiram, ao longo dos 4 meses, desenvolver formas de comunicar com os vários utentes e estabelecer relações de confiança com os mesmos. Também permitiu que desenvolvesse uma excelente relação com a equipa e que nos ajudássemos mutuamente sempre que necessário, melhorando assim o meu espírito de equipa e de entreatajuda. No fim desta importante etapa, considero-me uma pessoa mais polivalente e competente a nível profissional.

CAPÍTULO III

VESÍCULAS EXTRACELULARES DE PROTOZOÁRIOS FLAGELADOS: POTENCIAL APLICAÇÃO EM VACINAS

Monografia



**UNIVERSIDADE D
COIMBRA**

Sob a orientação da
Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa

LISTA DE ABREVIATURAS

ADI	<i>Arginine Deaminase</i>
AMEs	<i>Arginine Metabolic Enzymes</i>
BHE	Barreira Hematoencefálica
CDs	Células Dendríticas
CEIs	Células Epiteliais Intestinais
CI	Complexos Imunes
CMs	Corpos Multivesiculares
EF-1α	<i>Elongation Factor 1α</i>
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complexes Required for Transport</i>
ESPs	<i>Excretory-Secretory Products</i>
GGT I	<i>GammaGlutamyltransferase I</i>
GP	Glicoproteína
GPI	<i>Glycosylphosphatidylinositol</i>
HER2	<i>Human Epidermal growth Factor Receptor 2</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HSPs	<i>Heat Shock Proteins</i>
HuMIF	<i>Human macrophage Migration Inhibiting Factor</i>
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
INF-γ	<i>Interferon γ</i>
iNOS	<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
KMP-11	<i>Kinetoplastid Membrane Protein 11</i>
LC	Leishmaniose Cutânea
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LG	Lipoglicano
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LPG	<i>Lipophosphoglycan</i>
LV	Leishmaniose Visceral
MAPK	<i>Mitogen-Activate Protein Kinase</i>

MASPs	<i>Mucin Associated-Surface Proteins</i>
miRNA	micro RNA
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MPs	Micropartículas
MVs	Microvesículas
NF-kB	<i>Nuclear Factor kB</i>
NO	Nitric Oxide
OCT	<i>Ornithine Carbamoyltransferase</i>
PTFs	Proteínas Tirosina Fosfatasas
RNAm	RNA mensageiro
RNAr	RNA ribossómico
RNAt	RNA transportador
SHP 1	<i>Src Homology region 2 domain-containing Phosphatase 1</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
STI 1	<i>Stress-Inducible protein type 1</i>
TcTASV	<i>T. cruzi Trypomastigote Alanine, Serine and Valine rich proteins</i>
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
TSG 101	<i>Tumor Susceptibility Gene 101</i>
TvMIF	<i>T. vaginalis macrophage Migration Inhibiting Factor</i>
TvTSP	<i>T. vaginalis Tetraspanin</i>
VEs	Vesículas Extracelulares
VILs	Vesículas Intraluminais
VSPs	<i>Variant Surface Proteins</i>
WT	<i>Wild Type</i>

RESUMO

As vesículas extracelulares (VEs) são pequenas vesículas delimitadas por uma dupla camada lipídica, que se encontram ligadas à membrana plasmática e são libertadas tanto por organismos unicelulares como multicelulares. Estas estruturas de acordo com o seu tamanho, biogénese e conteúdo podem ser classificadas em exossomas (30-150 nm), microvesículas (MVs) (100-1000 nm) e corpos apoptóticos (100-5000 nm).

Parasitas protozoários flagelados como *Giardia lamblia*, *Leishmania spp.*, *Trichomonas vaginalis* e *Trypanosoma spp.* libertam VEs carregadas com diversos fatores de virulência que são essenciais na interação parasita-hospedeiro, nomeadamente na modulação do sistema imunológico do hospedeiro, podendo auxiliar no estabelecimento da infeção e consequentemente na exacerbação da mesma.

Várias são as aplicações das VEs, nomeadamente como marcadores de diagnóstico, agentes terapêuticos e também no âmbito das vacinas. No entanto, ainda são escassos os estudos sobre a aplicação das VEs em vacinas direcionadas para as doenças parasitárias, pelo que é essencial um melhor conhecimento destas estruturas e da maneira como estas atuam para eventualmente se poder evoluir no sentido do desenvolvimento de vacinas para este tipo de infeções.

Palavras-chave: Vesículas extracelulares, interação parasita-hospedeiro, fatores de virulência, vacinação, sistema imunológico.

ABSTRACT

Extracellular vesicles (EVs) are small vesicles bounded by a double lipid layer, which are attached to the plasma membrane and are released by unicellular and multicellular organisms. These structures according to their size, biogenesis and content can be classified into exosomes (30-150 nm), microvesicles (MVs) (100-1000 nm) and apoptotic bodies (100-5000 nm).

Flagellated protozoan parasites such as *Giardia lamblia*, *Leishmania spp.*, *Trichomonas vaginalis* and *Trypanosoma spp.* release EVs loaded with various virulence factors that are essential in the parasite-host interaction, namely in modulating the host's immune system, which can assist in the establishment of infection and consequently its exacerbation.

There are several applications of EVs, namely as diagnostic markers, therapeutic agents and also in the scope of vaccines. However, studies on the application of these EVs in vaccines targeting parasitic diseases are still scarce, so it is essential to have a better understanding of these structures and the way they work in order to eventually evolve towards the development of vaccines for this type of infections.

Keywords: Extracellular vesicles, parasite-host interaction, virulence factors, vaccination, immune system.

INTRODUÇÃO

Vesículas extracelulares (VEs)

As doenças parasitárias afetam bilhões de pessoas, sendo consideradas um importante problema de saúde pública. Por serem principalmente endêmicos de regiões pobres, os parasitas são amplamente negligenciados, no entanto, estima-se que cerca de 400 espécies parasitem os seres humanos e que aproximadamente 90 sejam responsáveis por uma grande carga clínica e taxas de mortalidade elevadas. Vários estudos demonstraram que há libertação de VEs durante as doenças parasitárias e que estas atuam tanto na comunicação entre parasitas como na interação parasita-hospedeiro.¹

As VEs são pequenas vesículas delimitadas por uma bicamada lipídica que se encontram ligadas à membrana plasmática, sendo libertadas tanto por parasitas unicelulares como multicelulares.² Embora a população destas vesículas seja heterogênea, elas são classificadas em 3 distintas categorias de acordo com a sua biogênese, tamanho e composição: exossomas, microvesículas (MVs) e corpos apoptóticos (Figura I). Os exossomas são as vesículas de menor dimensão, possuem origem endocítica e são libertados no meio através da fusão de corpos multivesiculares (CMVs) com a membrana plasmática da célula.³ As MVs também denominadas micropartículas (MPs) ou ectossomas são mais heterogêneas e são libertadas diretamente a partir da membrana plasmática. Os corpos apoptóticos representam as vesículas de maior dimensão e provêm de células que se encontram no processo de morte celular programada.^{3:4}

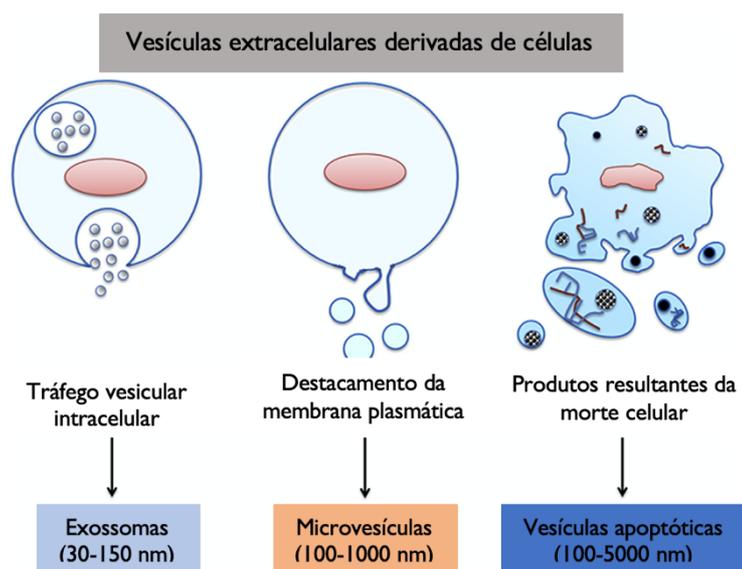


Figura I: Classificação das vesículas extracelulares de acordo com a biogênese e o tamanho.⁵

Até recentemente, estas vesículas eram praticamente desconhecidas e consideradas subprodutos do metabolismo celular. Esta situação mudou drasticamente quando se provou que as VEs desempenhavam importantes funções como mediadores da transmissão de sinais biológicos e respostas imunes. Uma vez que os parasitas possuem ciclos de vida complexos, nos quais a comunicação entre as células é essencial, as VEs parecem desempenhar um papel importante a muitos níveis, como por exemplo na adaptação do parasita ao ambiente em mudança do hospedeiro (face ao *stress* causado por medicamentos e alterações de pH) e na imunomodulação onde atuam como mensageiros, preparando a célula hospedeira para a infecção parasitária.¹

Determinados parasitas, como por exemplo os protozoários, libertam VEs que se fundem com as células do hospedeiro. Estas vesículas são capazes de mediar a transferência de diferentes moléculas, incluindo proteínas solúveis e de membrana, lípidos e ácidos nucleicos [micro RNA (miRNA), DNA e RNA mensageiro (RNAm)], causando modificações no fenótipo das células-alvo. Estão ainda envolvidas na adesão e invasão celular, na evasão e modulação da resposta imune e também na resistência a medicamentos.⁶ Assim, as VEs são importantes no estabelecimento das infecções parasitárias e poderão ser usadas como novos agentes terapêuticos e ferramentas de diagnóstico, assim como serem excelentes candidatas a vacinas.^{2:7}

Biogénese das VEs

Os exossomas são equivalentes ao citoplasma envolvido por uma bicamada lipídica na qual os domínios externos das proteínas transmembranares se encontram expostos ao ambiente extracelular.⁸ A sua síntese inicia-se nos endossomas precoces após endocitose de material extracelular na membrana plasmática e formação das vesículas intraluminais (VILs), que posteriormente formam os CMVs, que ao fundirem-se com a membrana plasmática libertam as VILs como exossomas (Figura 2). Um componente-chave neste processo é o complexo proteico hetero-oligomérico de seleção endossomal necessário para o transporte (ESCRT - *Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*), que reconhece cargas monoubiquitinadas e promove a sua inclusão nos CMVs.⁹

As MVs libertam-se diretamente da membrana plasmática para o meio extracelular após a incorporação seletiva de proteínas, ácidos nucleicos e lípidos. A sua síntese ocorre em resposta à ativação de processos celulares dependentes de Ca^{2+} . Estímulos externos como algum tipo de dano celular, resultam no influxo de Ca^{2+} que ativa proteases dependentes de

Ca²⁺, como a calpaína e a scramblase, que transportam fosfolípidos para o folheto externo da membrana plasmática, resultando então na formação das MVs.¹⁰

Os corpos apoptóticos formam-se através da condensação e segregação do núcleo e posterior degradação e formação de vesículas (*blebbing*) a partir da membrana plasmática.³

Os estudos sobre as VEs de parasitas são relativamente recentes e o conhecimento sobre a sua biogénese é escasso em comparação com o conhecimento sobre as VEs das células de mamíferos. No entanto, acredita-se que o processo geral para a síntese das VEs provenientes de parasitas seja semelhante ao das células de mamíferos, podendo-se traçar paralelismos entre estas VEs de origens díspares.¹¹

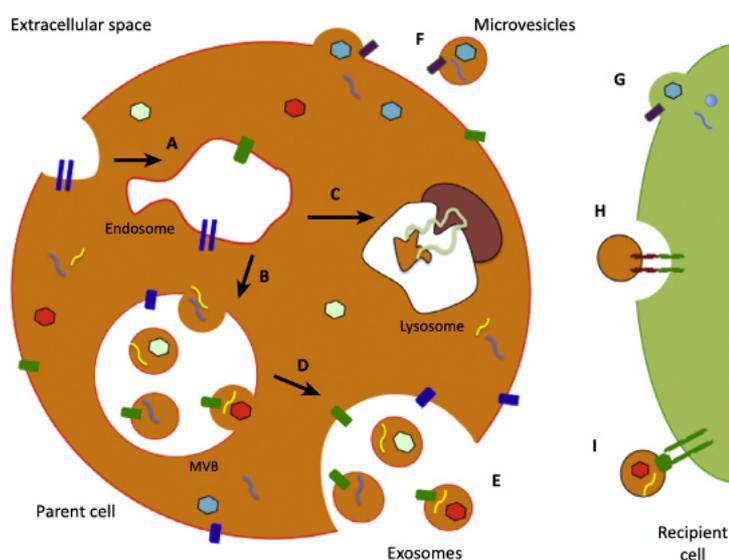


Figura 2: Biogénese e transferência de exossomas.

(A) Formação do endossoma precoce rodeado por diversas moléculas bioativas (ácidos nucleicos, lípidos e proteínas). (B) Formação das VILs (com conteúdo citosólico), que posteriormente formam os CMVs. (C) Alguns CMVs fundem-se com o lisossoma hidrolítico, sendo a carga vesicular degradada. (D) Os CMVs também se podem fundir com a membrana plasmática e libertar as VILs como exossomas no espaço extracelular. As VEs podem interagir com as células recetoras por vários mecanismos: fusão direta com a membrana plasmática da célula recetora (G), endocitose mediada pelo recetor após interações recetor-ligante entre as VEs e a célula recetora (H) e interação direta do recetor e ligante na superfície da célula recetora.¹²

Composição das VEs

A composição das VEs varia de acordo com o tipo de célula/organismo produtor, do estadio de desenvolvimento/fisiologia dessa célula/organismo e das condições ambientais.¹³ No entanto, as VEs partilham muitos constituintes, contendo e preservando componentes bioativos como proteínas solúveis, hidratos de carbono e lípidos, e material genético como DNA e RNA.¹¹

Proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC - *Major Histocompatibility Complex*) classe II e do ESCRT, tetraspaninas (CD37, CD53, CD63, CD81

e CD82), proteínas de choque térmico (HSPs - *Heat Shock Proteins*) 70 e 90 e proteínas adicionais requeridas por ESCRT, tais como Alix e proteína do gene de suscetibilidade a tumores 101 (TSG101 - *Tumor Susceptibility Gene 101*), são comumente encontradas nas VEs, independentemente da célula de origem, e podem ser usadas como marcadores gerais das VEs.¹⁴

Os lípidos são componentes essenciais para a formação e estrutura da bicamada das VEs, sendo estas enriquecidas principalmente em colesterol, esfingomiéline, fosfatidilserina e glicoesfingolípidos.¹³ Este enriquecimento é 2 a 3 vezes maior nas VEs do que nas células de origem demonstrando que tanto o conteúdo lipídico como o proteico pode variar consoante a origem destas estruturas.⁹

Uma clara diferenciação entre os exossomas e as MVs em termos de composição ainda é difícil, uma vez que há uma sobreposição de componentes detetados e propriedades físicas semelhantes.¹ No entanto, as MVs devido à sua origem na membrana plasmática, são normalmente mais ricas em integrinas, glicoproteína (GP) Ib e selectina P e transportam mais proteínas com modificações pós-traducionais como glicoproteínas ou fosfoproteínas, quando comparadas com os exossomas que são enriquecidos essencialmente em glicoproteínas e proteínas transmembranares. Estas informações representam uma potencial forma de distinguir as MVs dos exossomas com base no conteúdo e não no tamanho.^{14:15}

Aplicações Clínicas das VEs

As VEs estão claramente em ascensão no que diz respeito ao diagnóstico de doenças como o cancro e doenças infecciosas, bem como na tecnologia de células estaminais e imunologia, no desenvolvimento de vacinas e por fim em aplicações terapêuticas.¹⁶

Todos os tipos de células podem secretar VEs, sendo estas estruturas encontradas de forma natural em diferentes tipos de fluidos corporais, como saliva, sangue, urina, líquido cefalorraquidiano (LCR) e até mesmo no leite.⁹

No âmbito de marcadores de diagnóstico, as VEs apresentam várias características que as destacam para esta utilização, tais como a sua estrutura estável, o alto conteúdo plasmático e composição alternativa sob condições adversas. Moléculas específicas de tumores transportadas nas VEs podem ser utilizadas como marcadores de diagnóstico, como por exemplo o recetor tipo 2 de crescimento epidérmico humano (HER2 - *Human Epidermal growth factor Receptor 2*) para o cancro da mama e a γ -glutamyltransferase I (GGTI - *GammaGlutamyltransferase I*) para o cancro da próstata. Contudo, na prática clínica, ainda

não existe aplicação das VEs no diagnóstico de infecções por parasitas e apenas alguns estudos se concentraram no uso de VEs no diagnóstico de doenças parasitárias.⁹

Em relação à terapêutica, demonstrou-se que as VEs libertadas possuem propriedades imunomoduladoras, o que tem potenciado a investigação sobre as suas aplicações no tratamento de doenças, maioritariamente na proteção contra tumores. Alguns estudos revelaram efeitos anti-inflamatórios das VEs: o miRNA das VEs de *Plasmodium yoelii* inibiu a expressão de VEGFR2 e conseqüentemente a angiogênese, inibindo o crescimento de cancro de pulmão num modelo murino; a injeção intraperitoneal de VEs derivadas de CDs “desafiadas” por *Schistosoma japonicum* atenuou a progressão e gravidade da doença inflamatória intestinal camundongos. Estas evidências suportam o potencial uso, no futuro, das VEs como fármacos imunossupressores.^{6;9}

O uso de VEs provenientes de células dentríticas (CDs) em pacientes com melanoma ou com cancro de pulmão demonstrou os seus efeitos imunomoduladores. Administradas em conjunto com adjuvantes, estas vesículas podem representar uma nova estratégia na imunoterapia ativa.¹⁷ Em relação às doenças parasitárias, são espectáveis efeitos semelhantes, no entanto, ainda não estão relatados ensaios, havendo um crescente interesse em pesquisar a potencial utilização das VEs parasitárias, nomeadamente como veículos para imunização e conseqüente produção de vacinas.^{1;9}

GIARDIA LAMBLIA

Giardia lamblia (sinónimo de *G. duodenalis* ou *G. intestinalis*) é um parasita extracelular do intestino humano com elevada prevalência global, que causa doenças diarreicas tanto em países em desenvolvimento como em países industrializados.^{1;18}

G. lamblia apresenta um ciclo de vida monogenético e simples que compreende dois estádios: o quisto (forma infetante) e o trofozoíto (forma vegetativa que se reproduz). Os quistos (resistentes ao ambiente externo) após serem ingeridos por hospedeiros, humanos ou animais, através da água e/ou alimentos contaminados (transmissão fecal-oral), são expostos ao pH ácido do estômago que estimula o desenquistamento e posterior libertação dos trofozoítos. De seguida, os trofozoítos ligam-se às vilosidades do intestino delgado e aderem às células epiteliais intestinais (CEIs), onde se replicam por fissão binária.^{11;19} Ao descerem em direção ao cólon, são estimulados pelos sais biliares e pH alcalino e sofrem enquistamento. Os quistos formados são expulsos nas fezes e quando ingeridos por novos hospedeiros reinicia-se o ciclo.^{11;20;21}

Giardíase

A giardíase é uma doença entérica cujo agente etiológico é o protozoário *G. lamblia*.²² É uma infecção com distribuição global, com aproximadamente 280 milhões de casos por ano, sendo mais prevalente em ambientes com poucos recursos (condições habitacionais precárias, água não potável, baixa condição sócioeconómica) e comum em crianças e adultos.^{22;23} Esta patologia é transmitida maioritariamente por via fecal-oral, diretamente de pessoa para pessoa ou indiretamente através de água e alimentos contaminados. Também a transmissão zoonótica é possível, com cães e gatos a apresentarem um maior risco de transmitirem a infecção aos seres humanos.^{18;22}

As manifestações clínicas da infecção variam desde ausência de sintomas até diarreia aquosa aguda, náusea, dor epigástrica e perda de peso.²³ Estes sintomas surgem após replicação ativa dos trofozoítos, uma vez que estes ao aderirem à superfície das CEIs induzem um aumento da permeabilidade intestinal e comprometimento da absorção de nutrientes, causando má digestão, má absorção e desequilíbrio eletrolítico (culminando coletivamente em diarreia). Os sintomas geralmente são agudos, mas a cronicidade pode ocorrer e encontra-se, por razões ainda desconhecidas, associada a consequências mais graves como desnutrição, manifestações inflamatórias, síndrome do intestino irritável e sintomatologia extra-intestinal, incluindo artrite e alergia alimentar.²⁴ Várias hipóteses têm sido consideradas para justificar esta variabilidade, nomeadamente virulência dos *assemblages/genótipos* de *G. lamblia* e o estado imunológico e nutricional do hospedeiro.¹⁸

VEs na interação parasita-hospedeiro

G. lamblia liberta vesículas secretoras associadas ao processo de enquistamento.²⁵ Recentemente foi demonstrado que este parasita é também capaz de libertar MVs em resposta a mudanças ambientais (alterações de pH, presença de bilis, concentração de Ca^{2+}), sugerindo-se que esta resposta pode ser um mecanismo de adaptação a diferentes condições durante o decorrer da infecção e também um mecanismo para evitar a resposta imunológica inata.^{1;21;25;26}

Durante a interação parasita-hospedeiro verifica-se a produção de produtos excretorios-secretórios (ESPs - *Excretory-Secretory Products*) pelo parasita. Estes produtos são constituídos por VEs, proteínas secretadas e proteínas de superfície. Os ESPs afetam a expressão génica, secreção, sinalização, metabolismo e respostas imunes das CEIs. No entanto, embora os ESPs possam desempenhar um papel na indução da doença, estes efeitos são mais lentos e menos expressivos em comparação com aqueles induzidos pela ligação dos trofozoítos às CEIs.²⁴

Relativamente às MVs de *Giardia*, a sua libertação é favorecida a pH 7 e é inibida a pH 8 e na presença de bÍlis alcalina.^{4;10;11} As MVs demonstraram capacidade de promover a ligação dos parasitas às células hospedeiras. As monocamadas de células Caco-2 (semelhantes aos enterócitos que revestem o intestino delgado) foram incubadas com trofozoÍtos na presença de diferentes concentrações de MVs, durante 3h e a 37°C, tendo-se observado um aumento da ligação de *G. lamblia* às CEIs dependente da dose de MVs.²¹

As MVs de *G. lamblia* contribuem ainda para a maturação das CDs, sendo rapidamente internalizadas por estas. Um estudo onde as CDs imaturas foram pulsadas com MVs e cultivadas durante 24h permitiu avaliar esta capacidade. As CDs imaturas que capturaram as MVs apresentaram proliferação de células T, observada pela regulação positiva do marcador de ativação CD25.²⁷

A infeção por *G. lamblia* resulta numa forte alteração no perfil de expressão de genes de resposta ao stress e quimiocinas das células hospedeiras, bem como alterações transcricionais. Estas alterações induzem a libertação de enzimas que metabolizam a arginina (AMEs): deiminase da arginina (ADI) e ornitina carbamoil-transferase (OCT) e também a libertação de enolase, que inibem a proliferação celular, a produção de citocinas pelas CDs e desativam fatores imunolÓgicos do hospedeiro, incluindo Óxido nítrico (NO).^{21;24}

São vÁrios os componentes que se observam em ambos os estÁdios do parasita (trofozoÍto e quisto) e que desempenham funções cruciais no decorrer da infeção, nomeadamente ADI, OCT, enolase, fator de alongação I α (EF-I α), proteases de cisteÍna (catepsina B e giardipaÍna-I) e proteÍnas variÁveis de superfÍcie (VSPs).

As ADI e OCT sÁo dos fatores de virulência secretados por *G. lamblia* mais estudados. Estas enzimas competem com as células hospedeiras pela captação de arginina, substrato utilizado pela Óxido nítrico sintase indutÍvel (iNOS) para a produção de NO, havendo depleção de arginina e NO. O NO é um composto citotÓxico para *G. lamblia*, uma vez que inibe o seu crescimento e também o seu desenquistamento e enquistamento, no entanto, o seu papel ainda nÁo estÁ bem definido. Estas enzimas modificam ainda a produção de citocinas, uma vez que as CDs expostas Às ADI e OCT apresentaram baixa produção de IL-10 e IL-12p40 e uma alta produção de TNF- α .^{24;28}

Relativamente À enolase (enzima glicolÍtica) e EF-I α as suas funções ainda sÁo pouco conhecidas. No entanto, estudos referem que a enolase tem efeitos no processo de desenquistamento, uma vez que observaram uma capacidade reduzida de desenquistamento em parasitas portadores de mutações que inativam esta enzima. Quanto ao EF-I α sabe-se que

é uma proteína imunorreativa reconhecida pelos anticorpos de pacientes infectados anteriormente.²⁹

As proteases de cisteína estão associadas à indução da doença e à modulação imunológica, nomeadamente na rutura das junções epiteliais intestinais, apoptose das CEIs, degradação dos fatores imunes do hospedeiro (imunoglobulinas e quimiocinas), depleção de muco e desequilíbrio microbiano.^{18;24} A catepsina B é uma protease de cisteína secretada por *G. lamblia* que inibe a secreção de interleucina (IL) 8, reduzindo a quimiotaxia dos neutrófilos e provoca a rutura das vilinas (proteínas citoesqueléticas das CEIs).^{30;31} A giardipaina-I é uma protease que se acumula nas junções intercelulares do intestino e induz a deslocalização e degradação das proteínas das junções oclusivas (occludina e claudina), bem como a apoptose das CEIs, o que reforça a hipótese de que giardipaina-I é um fator de virulência de *G. lamblia*.³¹

Por fim, as VSPs são proteínas ricas em cisteína que cobrem a superfície dos trofozoítos e possuem a capacidade de variação antigénica, isto é, expressão de diferentes variantes de VSPs. São proteínas imunodominantes durante a infeção e apresentam-se como uma estratégia do parasita escapar ao sistema imunológico do hospedeiro. Estudos recentes sugerem que as VSPs também podem participar ativamente na lesão das CEIs através de atividades proteolíticas.^{18;24}

LEISHMANIA SPP.

As espécies de *Leishmania* apresentam um ciclo de vida digenético, com várias formas de desenvolvimento que alternam entre o vetor conhecido por “mosca-da-areia” e o hospedeiro vertebrado.³² Os insetos dos géneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (flebotomíneos) são os vetores das leishmanioses humanas no Velho e no Novo Mundo, respetivamente.¹⁷

Leishmania apresenta 2 morfologias celulares distintas: a promastigota metacíclica que se desenvolve no vetor (estadio infetante) e a amastigota que se desenvolve no hospedeiro mamífero (estadio de diagnóstico).³³

Os parasitas de *Leishmania* são transmitidos aquando da refeição de sangue da fêmea dos flebotomíneos, que injetam na derme do hospedeiro vertebrado, o promastigota metaciclífico (estadio extracelular flagelado) que se formou no intestino do vetor. No momento da libertação dos promastigotas metaciclíficos no *pool* sanguíneo, estes são endocitados pelas células fagocíticas e diferenciam-se em amastigotas intracelulares (contêm um pequeno flagelo disforme dentro da bolsa flagelar). Posteriormente, os amastigotas multiplicam-se nas células fagocíticas e podem ser transportados pela linfa e corrente sanguínea para vários tecidos e

órgãos (por exemplo, nódulos linfáticos, baço, fígado, medula óssea, pele) dependendo da resposta imunológica do hospedeiro e das espécies de *Leishmania* que estão envolvidas.³⁴

Leishmaniose

Leishmania, dividida em 2 subgêneros *L. leishmania* e *L. viannia*, é o agente etiológico da leishmaniose, uma doença parasitária prevalente em todo o mundo e a segunda protozoose mais mortal, logo a seguir à malária.^{17:34} Atinge milhões de pessoas em cerca de 98 países, causando 2 milhões de novos casos e 20 a 50 mil mortes por ano. Contudo, a leishmaniose é uma doença negligenciada, uma vez que ocorre principalmente em países em desenvolvimento e regiões muito pobres (países tropicais e subtropicais).⁹

Dependendo dos tecidos afetados, a leishmaniose pode ser dividida em 3 formas clínicas principais: Leishmaniose Cutânea (LC), Leishmaniose Mucocutânea (LMC) e Leishmaniose Visceral (LV). A LC por *L. major* e *L. mexicana* caracteriza-se por lesões cutâneas crônicas papulares, eritematosas, tipo placa ou ulcerativas. A LMC por *L. braziliensis* está associada a uma maior morbidade devido à destruição de tecidos mucocutâneos, como o nariz e septo nasal, orofaringe ou palato. A LV por *L. donovani* e *L. infantum* é a forma mais grave da doença, uma vez que há disseminação sistêmica do parasita. Este tipo de leishmaniose caracteriza-se por febre persistente, aumento do fígado e baço e pancitopenia resultante de hemofagocitose secundária na medula óssea, sendo letal se não for tratada.^{33:34}

VEs na interação parasita-hospedeiro

A primeira descrição das VEs de *Leishmania* no contexto de infecção parasitária data de 2008, onde vários fatores de virulência foram encontrados em VEs de *L. donovani* tais como a GP63, HSP 10, HSP 70 e proteína do tipo I induzida por stress (STI I).² Vários estudos avaliaram os efeitos dos exossomas de *Leishmania* na resposta imune, observando-se uma produção elevada de IL-10 e uma baixa produção de IL-8 e IL-12 e do fator de necrose tumoral α (TNF- α), com inibição da resposta imune dos monócitos ao interferão γ (IFN- γ) e promovendo a progressão da infecção.^{1:9;36:37} Além disso, verificaram que as CDs derivadas de monócitos também eram reguladas negativamente pelos exossomas de *L. donovani*, havendo diminuição da produção de algumas citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-12p70. Os exossomas induziram atividade pró-inflamatória com recrutamento de neutrófilos para o local da inoculação, o que conduziu a exacerbação da patologia.⁹ Os estudos demonstraram, ainda, que o pré-tratamento de camundongos com VEs de *L. donovani* sem HSP 100 (HSP 100 -/-) induz uma resposta pró-inflamatória e imunidade protetora, em vez da supressão do sistema

imunológico. Em contraste, o pré-tratamento de camundongos com VEs da estirpe selvagem (WT) e o *challenge* com promastigotas WT induz um aumento das lesões com maior produção de IL-4 e menor produção da proteína FOXP3, sugerindo um papel significativo da HSP100 na resposta Th2, responsável pela exacerbação da patologia.^{9;11}

Estudos sobre o impacto das VEs nos estádios intracelulares de *Leishmania spp.* indicaram que mudanças químicas no ambiente (temperatura e pH) alteram a quantidade de vesículas libertadas e a sua composição proteica.²⁵ A alteração da temperatura de 26°C para 37°C, que mimetiza o momento em que os parasitas são ingeridos pelo hospedeiro mamífero, induz um aumento da libertação das VEs pelos promastigotas metaciclícos (Figura 3) e um enriquecimento em HSPs (HSP 90 e 4 homólogos de HSP 70).^{10;11} As HSPs são proteínas expressas em condições de *stress* e desempenham um papel na sobrevivência e no desenvolvimento do parasita durante a transmissão do vetor para o hospedeiro de sangue quente.¹¹

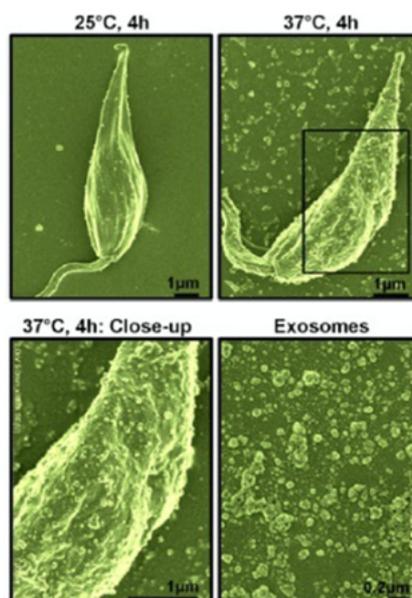


Figura 3: Influência da temperatura (25°C para 37°C) na libertação de VEs por *Leishmania*.³⁸

Também a alteração de pH a que o promastigota é exposto ao deixar o sangue (pH 7,5) e alcançar o fagolisossoma (pH 5,5) afeta a composição das VEs: a atividade de fosfatases aumenta a pH ácido (pH 5,5); a atividade de cinases e a atividade de EF-1 α e de GP63, aumentam a pH neutro (pH 7,5).^{11;17;25} Os estudos demonstraram que o pH baixo é fundamental para induzir a diferenciação dos promastigotas em amastigotas e alterar não só a expressão génica do parasita, como também o conteúdo proteico das VEs.^{9;11} A presença de EF-1 α a pH neutro desempenha um papel crucial na desativação dos macrófagos, uma vez que

ao induzir a ativação das proteínas tirosina fosfatases (PTFs) leva à modulação negativa da sinalização do INF- γ e inibição da produção de TNF- α e NO.^{9;11}

A GP63 é uma metaloprotease dependente de zinco presente na superfície das formas promastigota e amastigota de *Leishmania*. Esta protease é um fator de virulência de *Leishmania*, uma vez que desativa o sistema complemento, inibindo a lise do parasita, afeta o conteúdo proteico das VEs e modula vias de sinalização dos macrófagos (como as PTFs e os fatores de transcrição), de modo a inibir respostas inflamatórias e aumentar a sobrevivência do parasita no hospedeiro.^{1;11;13;39}

Usando-se as formas WT e *Knockout* (KO) para GP63 (GP63 -/-) verificou-se que a administração *in vivo* de VEs WT regulava a expressão dos recetores de INF- γ e IL-2. A administração *in vivo* de VEs de *Leishmania* GP63 -/- resultou em efeitos pró-inflamatórios, com o aumento do recrutamento de neutrófilos e eosinófilos.^{13;38} A GP63 também afetou a função das células hepáticas, reduzindo a clivagem do miRNA miR-122 mediada pela nuclease DICER1. A redução da atividade de miR-122 conduziu a alterações metabólicas nos hepatócitos e níveis mais baixos de colesterol, o que favoreceu a infecção do parasita, uma vez que um colesterol sérico alto é associado à redução da carga parasitária no fígado.¹³ A análise proteômica de exossomas KO e WT demonstrou que a maioria das proteínas detetadas nos exossomas WT estão ausentes nos exossomas KO e vice-versa. De 313 proteínas, 134 eram partilhadas entre WT e KO, 96 eram específicas de WT e 83 específicas de KO.⁴⁰ Estes resultados confirmaram o papel crítico da GP63 na seleção das proteínas nas VEs.⁹

A GP63 e o EF-I α alcançam o citoplasma da célula hospedeira e ativam múltiplas PTFs (Figura 4). A ativação das PTFs regula negativamente a sinalização do INF- γ impedindo a expressão eficaz do arsenal microbicida dos macrófagos (TNF- α e NO). Além de alterarem o fenótipo dos macrófagos, as VEs atenuam a resposta imune das CDs derivadas de monócitos e dos linfócitos T CD4⁺, suprimindo a resposta Th1 (necessária para eliminar a infecção).¹¹ No entanto, quando a quantidade de GP63 e EF-I α nas vesículas é reduzida, as funções referidas anteriormente não são conseguidas, sugerindo que as VEs secretadas por *Leishmania* são capazes de fornecer moléculas efetoras às células hospedeiras que, por sua vez, modulam a resposta imune de forma pró-parasitária, promovendo o estabelecimento de infecção e o desenvolvimento de infecção crónica. Dados obtidos *in vivo* apoiam o papel das PTFs na obtenção de um ambiente permissivo para os parasitas durante a infecção precoce, uma vez que a infecção por *Leishmania* em camundongos KO para PTFs resultou num atraso do espessamento da almofada das patas e diminuição da carga parasitária, bem como maior recrutamento de leucócitos.⁴¹

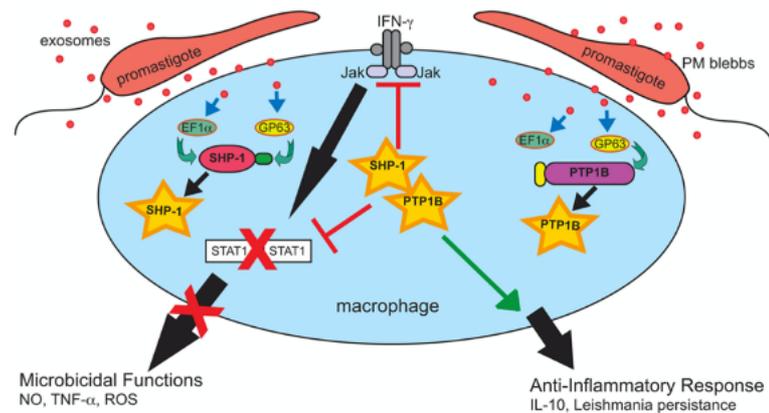


Figura 4: Os exossomos entregam compostos efetores como a GP63 e o EF-1 α que promovem a ativação de múltiplas PTFs, tais como a tirosina fosfatase I com homologia src 2 (SHP-1, e a PTF 1B), que desfosforilam os principais alvos das vias críticas de sinalização (via INF/Jak-STAT-1), resultando na interrupção da transdução de sinal e inibição das funções microbicidas dos macrófagos.⁴¹

Os efeitos da presença do lipofosfoglicano (LPG) nas VEs de *Leishmania* também foram estudados, uma vez que o LPG é um fator de virulência envolvido na interação parasita-hospedeiro.⁶ O gene *lpg 2* é o gene necessário para a síntese em geral de LPG e tendo isso como base realizaram-se estudos com vesículas *Leishmania* WT e vesículas de *Leishmania lpg 2 -/-*. Contudo, observaram-se resultados semelhantes com os 2 tipos de vesículas demonstrando-se que o LPG não é assim tão essencial para a instalação da infecção.^{41;42}

Para além de todos os componentes mencionados anteriormente, também a proteína II da membrana dos cinetoplastídeos (KMP-II) está presente nas VEs de *Leishmania*. Esta proteína é expressa durante os estádios de vida de *Leishmania* com uma expressão aumentada nas formas de promastigotas metacíclicas e amastigota, sugerindo um papel importante no hospedeiro mamífero. Uma das potenciais funções atribuída a esta proteína é a regulação negativa de iNOS nos macrófagos infetados, uma vez que possui um análogo estrutural da L-arginina (N^G-Metil-L-arginina) que é um conhecido inibidor da iNOS. No entanto, nenhum efeito inibidor da iNOS por parte da KMP-II foi mostrado nas células infetadas.⁴²

TRYPANOSOMA SPP.

O género *Trypanosoma* contém muitas espécies, no entanto, apenas *Trypanosoma cruzi* e *T. brucei* provocam doença em humanos.¹

T. cruzi apresenta um ciclo de vida digenético que alterna entre o vetor inseto triatomíneo hematófago (conhecido como o inseto “beijo”) e o hospedeiro mamífero. Os 3

vetores principais de triatomíneos incluem *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata*. Os vetores ingerem as formas tripomastigotas durante a refeição de sangue, que após migrarem para o intestino médio do vetor se irão diferenciar em epimastigotas (estadio replicativo). No reto do inseto, os epimastigotas diferenciam-se em tripomastigotas metaciclícos (forma infetante) que são libertados nas fezes do vetor e contaminam a pele do hospedeiro aquando da refeição de sangue. Os tripomastigotas metaciclícos invadem as células do hospedeiro, imunes e não imunes, onde se diferenciam em amastigotas intracelulares, que posteriormente se replicam e se convertem em tripomastigotas da corrente sanguínea. Esta replicação leva à lise da célula, havendo a disseminação do parasita através da linfa e sangue.^{3;11;35;43}

T. brucei de forma semelhante ao *T. cruzi* também é uma parasita com ciclo de vida digenético, no entanto, o vetor é a mosca tsé-tsé (*Glossina spp.*).¹ Os vetores ingerem as formas tripomastigotas de corrente sanguínea durante a refeição de sangue, que posteriormente se transformam nas formas procíclicas no intestino médio do vetor. As formas procíclicas ao migrarem para as glândulas salivares da mosca evoluem para epimastigotas, que posteriormente se replicam e transformam em tripomastigotas metaciclícos. Durante a picada do vetor, estes tripomastigotas são injetados e disseminam-se pelos fluidos corporais (sangue, linfa), transformam-se em tripomastigotas de corrente sanguínea e replicam-se por fissão binária.^{11;44}

Tripanossomíases

As tripanossomíases são doenças parasitárias causadas por parasitas do género *Trypanosoma* e são doenças tropicais negligenciadas, uma vez que estão associados à pobreza.⁴⁵ As tripanossomíases americana e africana constituem as 2 principais tripanossomíases sistémicas humanas, sendo *T. brucei* o agente etiológico da Tripanossomíase Africana ou Doença do Sono e *T. cruzi* o responsável pela Tripanossomíase Americana ou Doença de Chagas.⁹

A Doença do Sono pode ser devida a uma infeção por *T. b. gambiense*, na África Ocidental, ou por *T. b. rhodesiense*, na África Oriental, e é uma ameaça para mais de 70 milhões de pessoas que habitam a África subsariana e geralmente é fatal se não for tratada ou se tratada inadequadamente.⁴⁶ No entanto, após um longo período de crescente prevalência, a incidência da Doença do Sono parece estar a diminuir.¹ Esta patologia apresenta 2 fases: infeção linfática (fase I) onde os parasitas se multiplicam e disseminam pela corrente sanguínea, sistema linfático e órgãos sistémicos; fase tardia meningoencefálica após os parasitas atravessarem a

barreira hematoencefálica (BHE) e atingirem o sistema nervoso central (SNC), resultando numa ampla variedade de sintomas neurológicos como alterações de comportamento, confusão mental, distúrbios sensoriais e má coordenação motora.^{45;46}

A Doença de Chagas é uma doença endémica devastadora em 21 países da América Central e do Sul e afeta 6 a 7 milhões de pessoas, com um crescimento exponencial de 50 000 a 200 000 novos casos por ano.³ Como já referido é transmitida pelas fezes dos insetos triatomíneos, no entanto, existem outras formas de transmissão: vertical (congénita), transfusão de sangue, transplante de órgãos e contaminação oral por fluidos e alimentos contaminados, sendo considerada uma infeção reemergente.¹ Esta tripanossomíase apresenta 3 fases: a fase aguda que dura cerca de 2 meses com elevada disseminação do parasita, que é geralmente assintomática ou com sintomatologia leve (febre, dor de cabeça ou muscular) mas por vezes pode ser fatal; fase assintomática (também chamada de fase indeterminada ou intermediária) com função orgânica normal, mas evidência sorológica de infeção por *T. cruzi* que pode durar anos ou décadas; e a fase crónica resultante da ativação da resposta imune devido à elevada parasitémia, em que os indivíduos podem ser assintomáticos, resultando numa doença subclínica que dura décadas, ou sintomáticos em que 10 a 40% dos indivíduos desenvolvem cardiomiopatias ou patologias do trato digestivo.^{3;43}

VEs na interação parasita-hospedeiro

Em 1979 demonstrou-se que *T. cruzi* secretava VEs e que esta secreção dependia da temperatura, sendo mais abundante a 37°C, e era independente da presença de proteínas no meio de cultura (albumina e soro fetal de bezerro) e da estirpe em causa (Y, CAI, RA, YuYu).^{1;47} *T. cruzi* produz vesículas a partir do bolso flagelar dos diferentes estadios de vida (livre e intracelular) e estimula outras células, tais como as células hospedeiras, a produzirem VEs com o objetivo de modular a resposta imune do hospedeiro. Assim, as VEs estão envolvidas na invasão e patogénese deste parasita.^{1;35}

Quanto à sua composição, vários são os componentes presentes nas VEs de *T. cruzi*, tais como a GP85 (Tc85), GP82 e GP90, pertencentes à superfamília das transialidases (TS), GP63, mucinas, proteínas de superfície associadas à mucina (MASPs), cruzipaína e proteínas de tripomastigotas de *T. cruzi* ricas em alanina, serina e valina (TcTASV).^{1;3;25;48} Para além dos componentes referidos, também foram identificados pequenos RNAs que são principalmente derivados de ácido ribonucleico transportador (RNAt) e ribossómico (RNAr) e podem ser transmitidos para células hospedeiras, promovendo a transformação dos epimastigotas em tripomastigotas ou aumentando a suscetibilidade das células hospedeiras ao parasita,

respetivamente.⁹ No entanto, o papel desempenhado por estes RNAs nas infecções por *T. cruzi* ainda não está totalmente definido.¹

As TS presentes nos tripomastigotas metaciclícos e que contêm α -Galactosil (α -Gal), desempenham um papel essencial para *T. cruzi* uma vez que catalisam a transferência enzimática de ácido siálico dos glicoconjugados dos hospedeiros para os resíduos de mucina do parasita. Este processo é crucial porque *T. cruzi* é incapaz de sintetizar ácido siálico *de novo*, havendo necessidade de o obter a partir do hospedeiro infetado.¹ Os recetores presentes nas células do sistema imunitário, tais como neutrófilos, reconhecem o ácido siálico agora presente em *T. cruzi*, permitindo a internalização do mesmo. Portanto, esta constante remoção do ácido siálico contribui para a viabilidade e propagação do parasita no hospedeiro e tem implicações na fase aguda da doença, incluindo trombocitopenia ou apoptose das células imunes.^{1:3}

A Tc85 é capaz de se ligar a diferentes moléculas recetoras do hospedeiro (como citoqueratina e fibronectina) localizadas na superfície celular de monócitos, neutrófilos ou fibroblastos, permitindo a ação de enzimas, como a serina protease (que hidrolisa o colagénio) e deste modo contribuir para a adesão e invasão das células hospedeiras. As GP82 e GP90 encontram-se principalmente na membrana plasmática e apresentam papéis opostos relativamente à invasão celular de mamíferos. A GP82 ativa uma via de sinalização de Ca^{2+} nas células hospedeiras após a adesão do parasita, permitindo a internalização de *T. cruzi*, uma vez que o aumento de Ca^{2+} contribui para uma reorganização rápida e transitória dos microfilamentos das células hospedeiras.⁴⁹ Em contraste, GP90 (presente nos estadios intracelulares dos mamíferos) apresenta um efeito anti-fagocítico mediado pela remoção de açúcares necessários para a internalização do parasita, possuindo atividade de glicosidase e regulando negativamente a invasão de células hospedeiras provavelmente por se ligar às células dos mamíferos sem desencadear a via de sinalização de Ca^{2+} .⁴⁵

As mucinas (também contendo α -Gal) são compostos abundantes em açúcar e induzem respostas celulares e humorais que levam à produção de anticorpos líticos contra resíduos de α -Gal ligados à N-acetilglucosamina (epítipo sugerido para o diagnóstico da doença de Chagas). Ativam células através do recetor tipo *Toll* 2 (TLR2), promovendo a sinalização de proteínas cinase ativadas por mitogénio (MAPK) e, por conseguinte, a translocação do fator nuclear κB (NF- κB), componente essencial para a produção de citocinas, que resulta na produção de IL-12 e TNF- α . Assim, as mucinas desempenham um papel na interação parasita-hospedeiro e na modulação do sistema imunológico.^{17:51}

A cruzipaina é a principal protease de cisteína de *T. cruzi* e está presente em todos os estadios do parasita, sendo mais abundante nas formas em reprodução. Nos amastigotas

encontra-se ancorada ao glicosilfosfatidilinositol (GPI), no entanto, outras isoformas são secretadas por tripomastigotas metacíclicos, apresentando-se então como um fator de virulência na Doença de Chagas. A cruzipaina contribui para a invasão das células hospedeiras e desempenha um importante papel no desenvolvimento intracelular bem como na resposta imune do hospedeiro. O processo de invasão ocorre porque a cruzipaina promove a proteólise do cininogénio de baixo e alto pesos moleculares que conduz à formação de badricinina, que ao interagir com o seu recetor (recetor B2) leva ao aumento do Ca^{2+} . Este aumento de Ca^{2+} , como referido anteriormente, possibilita a internalização do parasita através da formação do seu vacúolo parasitóforo. Outra função atribuída à cruzipaina é a de mecanismo de evasão ao sistema imunológico, uma vez que é capaz de degradar todas as subclasses de imunoglobulina G (IgG) do hospedeiro.⁴⁹

Recentemente foi descrita a libertação de VEs pelo *T. cruzi* com cargas de proteínas MASPs. Estas proteínas MASPs são altamente expressas na superfície dos tripomastigotas metacíclicos *T. cruzi* e são compostas por uma região conservada C-terminal e uma região N-terminal codificando um péptido sinal (PS) que funcionam como sinais de localização. O estudo demonstrou que a formação dos complexos imunes (CIs) com as VEs, que secretam MASPs, favorece a captura das VEs pelos macrófagos dos hospedeiros, modulando a resposta imune contra o parasita e, possivelmente, promove a expansão e sobrevivência de *T. cruzi* nas células hospedeiras infetadas. A presença destes CIs em pacientes com Doença de Chagas é detetada na fase crónica da doença e estes CIs são formados com imunoglobulinas e antigénios secretados pelo parasita. No entanto, apesar do potencial destas estruturas na patogénese da Doença de Chagas, há uma escassez de estudos que abordem diretamente esta questão.⁵²

As TcTASV, recentemente descobertas e extensamente presentes nas VEs de tripomastigotas de *T. cruzi*, pertencem a uma família multigénica e parecem desempenhar funções críticas na interação parasita-hospedeiro. Tal como as MASPs, as TcTASV apresentam também as regiões N e C-terminais bastante conservadas. No entanto, a sua função ainda é desconhecida, sabendo-se apenas que a imunização de camundongos com TcTASV-C (sub-família de TcTASV) interferiu na fase aguda precoce da infeção por *T. cruzi*, conduzindo a uma forte resposta imune humoral. Estes factos sugerem que esta família de proteínas pode representar um novo fator de virulência participando nas etapas iniciais da infeção no hospedeiro mamífero.⁴⁸

Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de conhecer o papel das VEs deste parasita, assim como dos seus componentes, na interação com o hospedeiro mamífero. A maioria dos estudos demonstrou que os principais constituintes das VEs, tais como mucinas, TS e MASPs, protegem os parasitas contra o sistema imunológico, modulando a resposta

imune do hospedeiro mediada por citocinas e/ou formando uma densa camada de glicocálice, dificultando a destruição do parasita por anticorpos anti- α -Gal líticos. Estes componentes são reconhecidos pelos TLR2/6 e conduzem à produção de TNF- α em macrófagos e inibição da IL-12 em células dendríticas.¹

A administração de VEs em camundongos aumentou a parasitemia e diminuiu a sobrevivência dos camundongos quando estes foram posteriormente desafiados com *T. cruzi*, aumentando a produção de IL-4 e IL-10 no tecido cardíaco que levou à disseminação do parasita e aumento da mortalidade (Figura 5). Ao nível dos esplenócitos houve um aumento de IL-10 e de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , INF- γ e IL-6).⁵³ De salientar que a IL-10 é uma citocina muito importante envolvida nos mecanismos imunomoduladores durante a Doença de Chagas crônica, sendo a sua produção importante no equilíbrio entre as citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias e evitar danos aos tecidos.⁵¹ Todos estes dados têm permitido concluir que as VEs contribuem para um efeito pró-parasitário, preparando de alguma forma a célula hospedeira para o parasita.^{10;17}

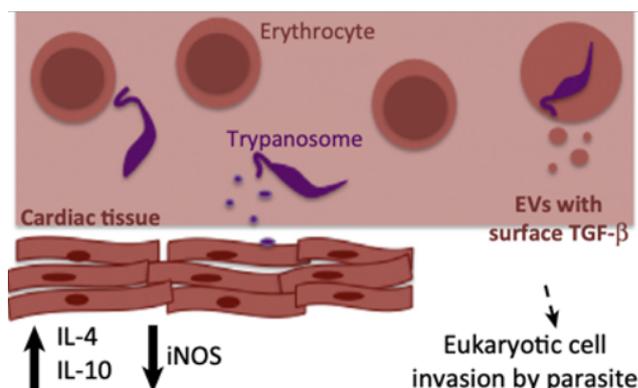


Figura 5: As VEs *T. cruzi* induzem a polarização Th2, caracterizada pelo aumento das IL-4 e IL-10 e uma diminuição de iNOS, e invasão do tecido cardíaco. Os eritrócitos e linfócitos infectados libertam VEs que contêm o fator de crescimento transformador beta (TGF- β).¹²

Um mecanismo adicional de evasão imune de *T. cruzi* consiste em induzir a liberação de VEs com TGF- β a partir das células hospedeiras, que ao ligarem-se aos tripomastigotas da corrente sanguínea, inibem a ação do complemento C3 convertase, contribuindo para a evasão imune e aumento da capacidade de infecção e sobrevivência do parasita (Figura 6).^{1;3;49}

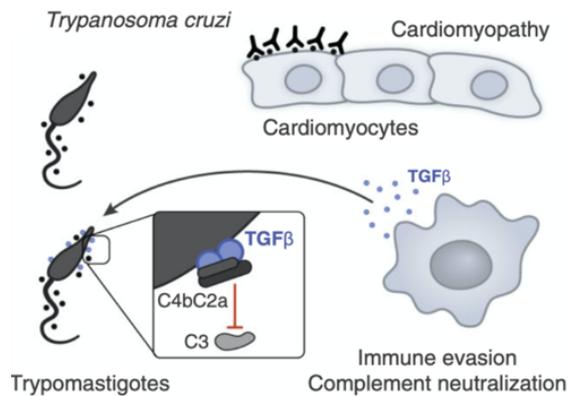


Figura 6: As VEs libertadas pelos monócitos ligam-se aos tripomastigotas de *T. cruzi* e protegem-nos da lise do complemento, ligando e neutralizando a C3 convertase.⁵⁴

TRICHOMONAS VAGINALIS

Trichomonas vaginalis é o agente etiológico da tricomoníase, a infecção sexualmente transmissível não viral mais comum em todo o mundo, com uma estimativa de 276 milhões de novos casos anualmente (8,1% em mulheres e 1,0% em homens). Caracteriza-se por ser um parasita extracelular que reside no trato genital inferior feminino e na uretra e próstata masculina, onde se replica por fissão binária, sendo a sua adesão às células epiteliais fundamental para a colonização do hospedeiro e estabelecimento de infecções.^{4;11;55;56}

Apresenta apenas o estadio de trofozoíto, sendo que este sofre mudanças na sua morfologia durante a interação com a célula hospedeira: inicialmente uma célula flagelada de movimento livre que, após a adesão, se torna achatada e se espalha pelo tecido da célula hospedeira, adquirindo a forma de ameba e aumentando a superfície de contacto com as células hospedeiras.^{4;55}

Relativamente à transmissão, *T. vaginalis* é transmitido diretamente de pessoa para pessoa, maioritariamente através das relações sexuais, uma vez que o parasita não apresenta formas de quisto ambientalmente resistentes. Por esta razão, é necessária uma educação no âmbito da prática de relações sexuais seguras, assim como o aconselhamento da não partilha de bens pessoais, tais como roupa interior.⁵⁴

Tricomoníase

A tricomoníase é uma doença sexualmente transmissível que afeta principalmente pessoas entre os 15 e 49 anos de idade. Embora a infecção assintomática seja comum, múltiplas situações clínicas podem surgir, tanto em mulheres como em homens, tais como vaginite, uretrite, prostatite, epididimite, parto prematuro e bebés com baixo peso no nascimento e

infertilidade.⁴ No entanto, os sintomas mais comuns incluem prurido, mau cheiro e dor durante relações sexuais ou micção.⁹

A tricomoníase pode ainda conferir uma suscetibilidade aumentada ao vírus da imunodeficiência humana (HIV) e está associada ao desenvolvimento de cancro do colo do útero e próstata, uma vez que *T. vaginalis* infeta as células epiteliais escamosas do trato genital. Porém, o mecanismo pelo qual esta situação ocorre é desconhecido.^{11;57}

Relativamente aos fatores predisponentes, estes incluem idade jovem, uso de contraceptivos orais, relações sexuais desprotegidas, tabagismo e fatores socioeconómicos, sendo a prevalência e a duração média da infeção dependentes da procura e acesso aos cuidados de saúde.⁵⁷

VEs na interação parasita-hospedeiro

Um estudo relatou a libertação aumentada de VEs por *T. vaginalis* durante o contacto com o hospedeiro, indicando que estas vesículas podem estar envolvidas na patogénese do parasita.⁴ Foi também demonstrado que as vesículas modulam a imunidade inata do hospedeiro ao regular os níveis das IL-6 e IL-8 (aumento de IL-6 e diminuição de IL-8), revelando a importância desta regulação no estabelecimento da infeção crónica no trato urogenital (Figura 7).^{2;25}

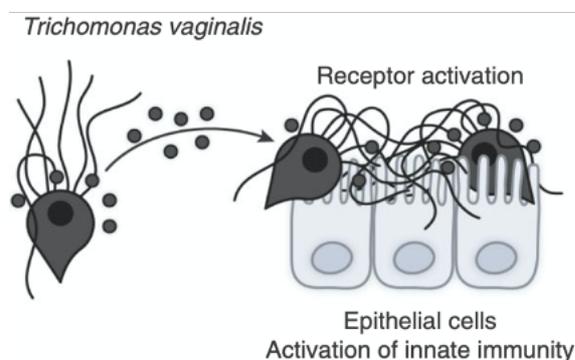


Figura 7: *Trichomonas vaginalis* secreta VEs e induzir a secreção de IL-6 e IL-8 nas células hospedeiras, ativando a expressão do recetor galectina-I na superfície das células epiteliais e, portanto, induzir a ligação do parasita.⁵⁴

Sendo a IL-8 uma citocina-chave para o recrutamento de neutrófilos, a sua diminuição é crítica no estabelecimento da infeção, uma vez que os neutrófilos são a 1ª linha na defesa contra *T. vaginalis*. Foi também demonstrado que estas vesículas contribuem para o aumento da adesão do parasita às células hospedeiras, promovendo a colonização do hospedeiro por *T. vaginalis* (Figura 8).^{2;4}

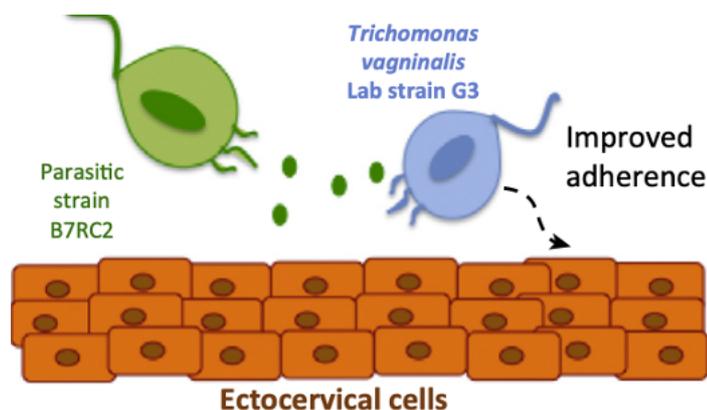


Figura 8: A pré-incubação com VEs da estirpe mais aderente de *T. vaginalis* (B7RC2) promove uma melhor adesão de estirpes menos aderentes (G3) às células ectocervicais.¹²

Num estudo em que se realizou pré-tratamento de camundongos fêmeas antes da infecção com *T. vaginalis*, verificou-se que estas VEs modificam o perfil de citocinas anti-inflamatórias e diminuem a inflamação vulvar nos camundongos. Este tratamento estimulou os macrófagos a produzirem citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) e as células epiteliais a produzirem a citocina anti-inflamatória IL-10. No entanto a produção de IL-10 foi muito superior à produção de IL-6 e TNF- α , demonstrando a resposta inflamatória induzida pelo pré-tratamento dos camundongos com as VEs de *T. vaginalis*.⁵⁸ Houve ainda inibição da produção de IL-13 (citocina anti-inflamatória) e IL-17 (citocina pró-inflamatória) e da produção de NO, sugerindo mais uma vez que as VEs de modulam a resposta imune do hospedeiro e atenuam reações inflamatórias.^{9;58}

As VEs de *T. vaginalis* apresentam também potencial para mediar as interações parasita-parasita através de mecanismos ainda pouco conhecidos. As VEs de estirpes (B7RC2) que aderem extensivamente às células epiteliais do hospedeiro quando incubadas com estirpes pouco aderentes (G3), conferem um aumento das propriedades de adesão às estirpes G3.^{1;2;7} Apesar dos mecanismos subjacentes a estes efeitos ainda não serem conhecidos, sabe-se que os níveis de tetraspanina 6 de *T. vaginalis* (TvTSP6) são baixos na estirpe G3 (menos aderente) e altos na estirpe B7RC2 (mais aderente), podendo sugerir-se que TvTSP6 desempenha um papel na adesão e, conseqüentemente, na virulência do parasita.^{11;12}

Para além de TvTSP6, outros componentes têm sido descritos nas VEs e parecem estar envolvidos no estabelecimento da infecção parasitária, tais como a TvTSP8, que regula a formação de aglomerados, o Bsp4 que medeia a adesão do parasita ao ligar-se à proteína fibronectina e ao fator de coagulação fibrinogénio e ainda o lipoglicano (LG) que se liga à galectina-I (recetor de *T. vaginalis* presente nas células hospedeiras).^{4;59;60}

De salientar, que nas VEs de *T. vaginalis* também está presente o fator de inibição da migração de macrófagos de *T. vaginalis* (TvMIF) que se liga a CD74 e ativa as vias de fosforilação

ERK e Akt/BAD, causando uma desregulação imunológica.⁶¹ Este fator pode substituir o fator de migração humana (HuMIF) e acionar a libertação de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo potencialmente para o aumento do risco de desenvolver cancro de próstata em homens infetados.⁶²

Apesar das consequências resultantes da tricomoníase, pouco se sabe sobre os fatores parasitários e dos hospedeiros envolvidos na aderência, sendo também necessários mais estudos para conhecer os mecanismos de modulação das respostas imunes do hospedeiro por parte das VEs.^{4:59}

POTENCIAL APLICAÇÃO DAS VEs DE PARASITAS EM VACINAS

De entre as muitas utilizações das VEs, é de grande interesse estudar a aplicação das VEs parasitárias em vacinas, uma vez que muitas das doenças provocadas por parasitas não respondem aos tratamentos e não existem vacinas.

O potencial de VEs como novas vacinas foi demonstrado contra alguns parasitas, nomeadamente *Toxoplasma gondii*, *P. yoelii* e *L. major*. Onde as VEs de CDs carregadas de antigénios provenientes de *T. gondii* e *L. major* ou as VEs provenientes de reticulócitos infetados com *P. yoelii* protegeram os camundongos da infeção.¹

O tratamento de camundongos com vesículas derivadas de CDs carregadas com antigénios de *T. gondii* (parasita responsável pela toxoplasmose) provocou respostas imunes humoral e celular e protegeu os camundongos contra subsequente infeção. Estas vesículas induziram uma resposta imune do tipo Th1, com elevada produção de INF- γ , IL-12 e IgG2a.³⁷

Também o uso de vesículas derivadas de CDs carregadas com antigénios de *L. major* conferiu proteção em camundongos. A proteção foi definida em termos do tamanho das lesões desenvolvidas na almofada da pata direita e no número de células parasitadas nos gânglios linfáticos, tendo sido o tamanho da lesão significativamente menor, assim como o número de células parasitadas nos camundongos imunizados.¹

As vesículas isoladas de camundongos infetados com o parasita *P. yoelii* (parasita responsável pela malária) continham proteínas parasitárias e foram usadas com sucesso na imunização de camundongos *naïve*, fornecendo proteção contra infeções posteriores por *P. yoelii*.⁸ Verificaram a produção de anticorpos IgG que reconheceram os glóbulos vermelhos infetados e por sua vez diminuíram o nível de parasitémia, permitindo que os camundongos infetados sobrevivessem por mais tempo.⁸

Estes dados indicam que a imunização com VEs parasitárias pode levar à tolerância do hospedeiro face ao parasita, após desafio com o mesmo. Tolerância esta em parte devida a

uma ativação do sistema imunológico do hospedeiro mediada pelas VEs. No entanto, os parasitas têm ciclos de vida muito diferentes e, portanto, não podemos generalizar os efeitos destas vesículas no hospedeiro.¹¹

Embora estas vesículas possam ter potencial aplicação em vacinas, existem questões conceituais e práticas que precisam de ser abordadas previamente, nomeadamente a obtenção das VEs com a correta mistura de antígenos, por forma a fornecerem proteção, e também a compreensão do mecanismo através do qual estas vesículas induzem respostas imunes específicas no hospedeiro.^{10;63}

CONCLUSÃO

As doenças parasitárias continuam a ter um enorme impacto na saúde pública em todo o mundo, apesar dos esforços globais para controlo, eliminação e erradicação de muitos dos principais parasitas humanos. Face à resistência aos medicamentos e falta de vacinas eficazes, é crucial um melhor conhecimento da capacidade intrínseca dos parasitas para manipularem as respostas do sistema imunológico do hospedeiro, com objetivo de futuramente se alcançar a erradicação das infeções parasitárias.²

As VEs consideradas inicialmente como um meio para os parasitas se “livrarem” de produtos do seu metabolismo, sabe-se atualmente que desempenham funções essenciais na interação parasita-hospedeiro. Neste contexto de interação parasita-hospedeiro, a libertação de VEs com a transferência de biomoléculas (por exemplo miRNA e proteínas), pode modificar o fenótipo e função das células-alvo.²⁵

Como muitas das infeções parasitárias são crónicas, é suposto que os parasitas comunicam com o hospedeiro por um longo período de tempo. Assim, o papel das VEs derivadas de parasitas apresenta-se potencialmente importante na interação parasita-hospedeiro. Contudo, existem ainda poucos estudos que avaliam os efeitos das VEs na infeção parasitária.⁶⁴

A caracterização detalhada das VEs poderá descrever novas moléculas que são específicas dos parasitas e essenciais no desenvolvimento da infeção. Atendendo a que as VEs transportam inúmeros materiais biológicos, poderão tornar-se um alvo interessante em imunoterapia e vacinação.⁶⁴

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MARCILLA, Antonio *et al.* - Extracellular vesicles in parasitic diseases. **Journal of Extracellular Vesicles**. 3:25040 (2014).
2. MARTI, M.; JOHNSON, P. J. - Emerging roles for extracellular vesicles in parasitic infections. **Current Opinion in Microbiology**. (2016) 66–70.
3. TORRÓ, Luis M. D. Pablos; MOREIRA, Lissette Retana; OSUNA, Antonio - Extracellular vesicles in chagas disease: A new passenger for an old disease. **Frontiers in Microbiology**. 9:1190 (2018) 1–11.
4. NIEVAS, Yesica R. *et al.* - Membrane-shed vesicles from the parasite *Trichomonas vaginalis*: characterization and their association with cell interaction. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 75:12 (2018) 2211–2226.
5. DE VHARE, Pradip B.; RAY, Ratna B. - Extracellular vesicles: Novel mediator for cell to cell communications in liver pathogenesis. **Molecular Aspects of Medicine**. (2018) 115–122.
6. CAMPOS, João Henrique *et al.* - Extracellular Vesicles: Role in Inflammatory Responses and Potential Uses in Vaccination in Cancer and Infectious Diseases. **Journal of Immunology Research**. 2015:2 (2015) 1–14.
7. TWU, Olivia; JOHNSON, Patricia J. - Parasite Extracellular Vesicles: Mediators of Intercellular Communication. **PLoS Pathogens**. 10:8 (2014) 1–3.
8. SCHOREY, Jeffrey S. *et al.* - Exosomes and other extracellular vesicles in host–pathogen interactions. **EMBO reports**. 16:1 (2015) 24–43.
9. WU, Zhenyu *et al.* - Extracellular vesicle-mediated communication within host-parasite interactions. **Frontiers in Immunology**. 9:3066 (2019).
10. GAVINHO, Bruno *et al.* - A new landscape of host-protozoa interactions involving the extracellular vesicles world. **Parasitology**. 145:12 (2018) 1521–1530.
11. MARD AHL, Maibritt; BORUP, Anne; NEJSUM, Peter - **A new level of complexity in parasite-host interaction: The role of extracellular vesicles**. 1st. ed. 1 : Elsevier Ltd, (2019).
12. COAKLEY, Gillian; MAIZELS, Rick M.; BUCK, Amy H. - Exosomes and Other Extracellular Vesicles: The New Communicators in Parasite Infections. **Trends in Parasitology**. (2015) 477–489.

13. KUIPERS, Marije E. *et al.* - Pathogen-derived extracellular vesicle-associated molecules that affect the host immune system: An overview. **Frontiers in Microbiology**. 9:2182 (2018).
14. ZABOROWSKI, Mikołaj P. *et al.* - Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. **BioScience**. 65:8 (2015) 783–797.
15. DOYLE, Laura M.; WANG, Michael Z. - Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. **Cells**. 8:7 (2019).
16. OLIVIER, Martin; FERNANDEZ-PRADA, Christopher - Leishmania and its exosomal pathway: A novel direction for vaccine development. **Future Microbiology**. 14:7 (2019) 559–561.
17. TORRECILHAS, Ana Claudia *et al.* - Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan diseases. **Microbes and Infection**. 14:15 (2012) 1465–1474.
18. HEMPHILL, Andrew; MÜLLER, Norbert; MÜLLER, Joachim - Comparative pathobiology of the intestinal protozoan parasites giardia lamblia, entamoeba histolytica, and cryptosporidium parvum. **Pathogens**. 8:3 (2019) 1–21.
19. DEOLINDO, Poliana; EVANS-OSES, Ingrid; RAMIREZ, Marcel Ivan - Microvesicles and exosomes as vehicles between protozoan and host cell communication. **Biochemical Society Transactions**. 41:1 (2013) 252–257.
20. LAUWAET, Tineke *et al.* - Encystation of Giardia lamblia: A model for other parasites. **Current Opinion in Microbiology**. 10:6 (2007) 554–559.
21. EVANS-OSES, Ingrid *et al.* - Microvesicles released from Giardia intestinalis disturb host-pathogen response in vitro. **European Journal of Cell Biology**. 96:2 (2017) 131–142.
22. AW, Jessica Y. H. *et al.* - Giardia duodenalis infection in the context of a community-based deworming and water, sanitation and hygiene trial in Timor-Leste. **Parasites and Vectors**. 12:1 (2019) 4–13.
23. HOOSHYAR, H. *et al.* - Giardia lamblia infection: Review of current diagnostic strategies. **Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench**. 12:1 (2019) 3–12.
24. MA'AYEH, Showgy Y. *et al.* - Characterization of the Giardia intestinalis secretome during interaction with human intestinal epithelial cells: The impact on host cells. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 11:12 (2017) 1–41.
25. EVANS-OSES, Ingrid; REICHEMBACH, Luis H.; RAMIREZ, Marcel I. - Exosomes or microvesicles? Two kinds of extracellular vesicles with different routes to modify protozoan-

host cell interaction. **Parasitology Research**. 114:5 (2015) 3567–3575.

26. MONTANER, Sergio *et al.* - The role of extracellular vesicles in modulating the host immune response during parasitic infections. **Frontiers in Immunology**. (2014) 1–9.

27. RINGQVIST, Emma *et al.* - Release of metabolic enzymes by Giardia in response to interaction with intestinal epithelial cells. **Molecular and Biochemical Parasitology**. 159:2 (2008) 85–91.

28. BANIK, Stefanie *et al.* - Giardia duodenalis arginine deiminase modulates the phenotype and cytokine secretion of human dendritic cells by depletion of arginine and formation of ammonia. **Infection and Immunity**. 81:7 (2013) 2309–2317.

29. CERTAD, Gabriela *et al.* - Pathogenic Mechanisms of Cryptosporidium and Giardia. **Trends in Parasitology**. 33:7 (2017) 561–576.

30. XANDER, Patricia; CRONEMBERGER-ANDRADE, André; TORRECILHAS, Ana - **Extracellular vesicles in parasitic disease**. 1st. ed. 1 : Elsevier Ltd, (2020).

31. ORTEGA-PIERRES, Guadalupe *et al.* - Giardipain-1, a protease secreted by Giardia duodenalis trophozoites, causes junctional, barrier and apoptotic damage in epithelial cell monolayers. **International Journal for Parasitology**. 48:8 (2018) 621–639.

32. ATAYDE, V. D. *et al.* - Leishmania exosomes and other virulence factors: Impact on innate immune response and macrophage functions. **Cellular Immunology**. (2016).

33. SUNTER, Jack; GULL, Keith - Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open biology**. 7:9 (2017).

34. SOULAT, Didier; BOGDAN, Christian - Function of macrophage and parasite phosphatases in leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**. 8:1838 (2017).

35. JONES, Leandra B. *et al.* - Pathogens and their effect on exosome biogenesis and composition. **Biomedicines**. 6:3 (2018).

36. SAMPAIO, Natalia Guimaraes; CHENG, Lesley; ERIKSSON, Emily M. - The role of extracellular vesicles in malaria biology and pathogenesis. **Malaria Journal**. 16:245 (2017).

37. LI, Yawen *et al.* - Characterization of exosomes derived from Toxoplasma Gondii and their functions in modulating immune responses. **International Journal of Nanomedicine**. (13:2018) 467–477.

38. DONG, George; FILHO, Alonso Lira; OLIVIER, Martin - Modulation of host-pathogen communication by extracellular vesicles (EVs) of the protozoan parasite Leishmania.

Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 9:100 (2019).

39. MARSHALL, Skye *et al.* - Extracellular release of virulence factor major surface protease via exosomes in *Leishmania infantum* promastigotes. **Parasites and Vectors.** 11:355 (2018) 1–10.
40. HASSANI, Kasra *et al.* - Absence of metalloprotease GP63 alters the protein content of leishmania exosomes. **PLoS ONE.** 9:4 (2014).
41. SILVERMAN, Judith M.; REINER, Neil E. - *Leishmania* exosomes deliver preemptive strikes to create an environment permissive for early infection. **Frontiers in cellular and infection microbiology.** 1:26 (2011).
42. BIFELD, Eugenia; CLOS, Joachim - The genetics of *Leishmania* virulence. **Medical Microbiology and Immunology.** 204:6 (2015) 619–634.
43. GUARNER, Jeannette - Chagas disease as example of a reemerging parasite. **Seminars in Diagnostic Pathology.** 36:3 (2019) 164–169.
44. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - **African Trypanosomiasis - Biology.** Disponível em <https://www.cdc.gov>
45. PEREIRA, Rodrigo M. *et al.* - Applicability of plant-based products in the treatment of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* infections: A systematic review of preclinical in vivo evidence. **Parasitology.** 144:10 (2017) 1275–1287.
46. KENNEDY, Peter G. E. - Update on human African trypanosomiasis (sleeping sickness). **Journal of Neurology.** 266:9 (2019) 2334–2337.
47. GONÇALVES, Marinei F. *et al.* - *Trypanosoma cruzi*: Shedding of surface antigens as membrane vesicles. **Experimental Parasitology.** 72:1 (1991) 43–53.
48. CAEIRO, Lucas D. *et al.* - The protein family TcTASV-C is a novel *Trypanosoma cruzi* virulence factor secreted in extracellular vesicles by trypomastigotes and highly expressed in bloodstream forms. **PLoS Neglected Tropical Diseases.** 12:5 (2018) 1–26.
49. BORGES, Bruna C. *et al.* - Mechanisms of infectivity and evasion derived from microvesicles cargo produced by *trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.** 6:161 (2016) 1–7.
50. PECH-CANUL, Ángel De La Cruz; MONTEÓN, Victor; SOLÍS-OVIEDO, Rosa Lidia - A Brief View of the Surface Membrane Proteins from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Parasitology Research.** 2017:3751403 (2017).

51. NOGUEIRA, Paula M. *et al.* - Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses. **Journal of Extracellular Vesicles**. 4:1 (2015) 28734.
52. DÍAZ LOZANO, Isabel María *et al.* - Immune complexes in chronic Chagas disease patients are formed by exovesicles from *Trypanosoma cruzi* carrying the conserved MASP N-terminal region. **Scientific Reports**. 7:44451 (2017) 1–14.
53. SZEMPRUCH, Anthony J. *et al.* - Sending a message: Extracellular vesicles of pathogenic protozoan parasites. **Nature Reviews Microbiology**. 14:11 (2016) 669–675.
54. MANTEL, Pierre Yves; MARTI, Matthias - The role of extracellular vesicles in *Plasmodium* and other protozoan parasites. **Cellular Microbiology**. 16:3 (2014) 344–354.
55. GERWEN, Olivia T. VAN; MUZNY, Christina A. - Recent advances in the epidemiology, diagnosis, and management of trichomonas vaginalis infection. **F1000Research**. (2019) 1–9.
56. KISSINGER, Patricia - Trichomonas vaginalis: A review of epidemiologic, clinical and treatment issues. **BMC Infectious Diseases**. 15:1 (2015) 1–8.
57. BOUCHEMAL, Kawthar; BORIES, Christian; LOISEAU, Philippe M. - Strategies for Prevention and Treatment of Trichomonas vaginalis Infections. **Clinical Microbiology Reviews**. 30:3 (2017) 811–825.
58. OLMOS-ORTIZ, L. M. *et al.* - Trichomonas vaginalis exosome-like vesicles modify the cytokine profile and reduce inflammation in parasite-infected mice. **Parasite Immunology**. 39:6 (2017) 1–10.
59. TWU, Olivia *et al.* - Trichomonas vaginalis Exosomes Deliver Cargo to Host Cells and Mediate Host:Parasite Interactions. **PLoS Pathogens**. 9:7 (2013) 22–24.
60. NOËL, Christophe J. *et al.* - Trichomonas vaginalis vast BspA-like gene family: Evidence for functional diversity from structural organisation and transcriptomics. **BMC Genomics**. 11:1 (2010).
61. TWU, Olivia *et al.* - Trichomonas vaginalis homolog of macrophage migration inhibitory factor induces prostate cell growth, invasiveness, and inflammatory responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 111:22 (2014) 8179–8184.
62. LEITSCH, David - Recent Advances in the Trichomonas vaginalis Field. **F1000Research**. (5:2016) 1–7.

63. LI, Yawen; ZHOU, Huaiyu - Moving towards improved vaccines for *Toxoplasma gondii*. **Expert Opinion on Biological Therapy**. 18:3 (2018) 273–280.
64. KHOSRAVI, Mojdeh *et al.* - Isolation and functions of extracellular vesicles derived from parasites: The promise of a new era in immunotherapy, vaccination, and diagnosis. **International Journal of Nanomedicine**. (2020) 2957–2969.